

Kjemisk og biologisk karakterisering av bærekstrakter fra svartsurbær, *Aronia melanocarpa*

Luan Van Vo



Masteroppgave i farmasi
Avdeling For Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt

UNIVERSITETET I OSLO

2009

Kjemisk og biologisk karakterisering av bærekstrakter fra svartsurbær, *Aronia melanocarpa*

Luan Van Vo

Masteroppgave i farmasi
Avdeling For Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt

UNIVERSITETET I OSLO

2009

Veileder: Hilde Barsett

Forord

Denne masteroppgaven ble utført fra mai 2008 til mai 2009 ved avdeling for farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Jeg vil først rette en stor takk til min veileder Hilde Barsett for god faglig hjelp og veiledning, for all oppmuntring og god støtte. Din veiledning har bidratt til et veldig lærerikt og interessant år for meg. Tusen takk.

Videre vil jeg takke følgende personer:

- Professor, Karl Malterud for gjennomføring måling av DPPH radikal Scavenger aktivitet.
- Professor, Helge Christensen og Siri Johansen for utføring av mikrosomforsøk med midazolam.
- Finn Tønnesen for GC-MS kjøring.
- Anne Vestrheim for veiledning under komplementfikseringstest.
- Mine medstudenter og alle ansatte i FI for et godt og trivelige år.
- Min familie og jenta mi for all støtte som jeg fikk under hele studien. Dere er best!

Innhold

1. FORKORTELSER.....	9
2. SAMMENDRAG.....	12
3. INNLEDNING.....	14
3.1 SVARTSURBÆR – ARONIA MELANOCARPA.....	14
3.1.1 Botanikk.....	15
3.1.2 Bruk.....	15
3.1.3 Innholdsstoffer.....	16
3.1.4 Effekter.....	17
3.2 MEDFØDT OG ERVERVET INFEKSJONSFORSVAR.....	20
3.2.1 Komplementsystem.....	20
3.3 KARBOHYDRAT.....	22
3.3.1 Polysakarider i planter.....	24
3.3.2 Pektintype polysakkarider.....	26
3.4 CYTOKROM P450.....	28
4. OPPGAVENS MÅL.....	29
5. METODER.....	30
5.1 GENERELLE METODER.....	30
5.1.1 Vannkvalitet.....	30
5.1.2 Innveiting.....	30
5.1.3 Sentrifugering.....	30
5.1.4 Blanding av løsninger.....	30
5.1.5 Filtrering.....	30
5.1.6 Degassing/Ekvakuering av luft.....	31
5.1.7 Oppkonsentrering.....	31

5.1.8	Absorbansmålinger.....	31
5.1.9	Frysetørking.....	31
5.1.10	Vask av dialyseslanger.....	32
5.1.11	Dialyse	33
5.1.12	Syrevasking av glassutstyr	34
5.2	PREPARERING OG EKSTRAKSJON AV BÆRMATERIALE.....	35
5.2.1	Preparering av svarsurtbærmateriale.....	35
5.2.2	Ekstraksjon av pulversert bærmateriale.....	36
5.2.2.1	Ekstraksjon med 50 % etanol.....	36
5.2.2.2	Ekstraksjon med 50 % etanol.....	37
5.2.2.3	Ekstraksjon med 50 °C vann	38
5.2.2.4	Ekstraksjon med 100°C vann	39
5.3	OPPRENSING OG SEPARERING AV POLYSAKKARIDER	40
5.3.1	Absorpsjonskromatografi med amberlite XAD-7HP kolonne	40
5.3.2	Gelfiltrering med Bio-Gel P-6 DG kolonne	42
5.3.3	Separering med PD-10 Desalting kolonne.....	44
5.3.4	Ionebytterkromatografi med ANX Sepharose 4 Fast Flow kolonne	45
5.4	BIOLOGISK AKTIVITET.....	48
5.4.1	Komplementfikseringstest.....	48
5.4.2	Påvirkning på CYP3A4 +b5 – Metabolisme av midazolam	52
5.4.3	Antimikrobiell aktivitet.....	54
5.4.4	Måling av DPPH radikal scavenger aktivitet	57
5.5	KVALITATIV OG KVANTITATIV BESTEMMELSE AV KARBOHYDRATINNHOLD	59
5.5.1	Testing for karbohydratinnhold med fenol-svovelsyretest.....	59

5.5.2	<i>Monosakkaridbestemmelse</i>	60
5.5.2.1	<i>Metanolyse</i>	60
5.5.2.2	<i>TMS-derivatisering</i>	61
5.5.2.3	<i>GC-FID</i>	62
5.6	STRUKTUROPPLARING	65
5.6.1	<i>Identifikasjon av AG-II med Yariv reagens test</i>	65
5.6.2	<i>Bindingsbestemmelse</i>	66
5.6.2.1	<i>Karboksylysrereduksjon</i>	66
5.6.2.2	<i>Metyleringsmetode</i>	68
5.6.2.3	<i>Hydrolyse</i>	70
5.6.2.4	<i>Reduksjon</i>	71
5.6.2.5	<i>Acetylering</i>	73
5.6.2.6	<i>GC-Ms</i>	74
6.	RESULTATER OG DISKUSJON	76
6.1	PREPARERING OG EKSTRAKSJON AV BÆRMATERIALE	76
6.1.1	<i>Preparering av svartsurbær-materiale</i>	76
6.1.2	<i>Ekstraksjon med etanol og vann</i>	76
6.2	OPPRENSING OG SEPARERING AV POYSAKKARIDER	77
6.2.1	<i>Absorpsjonskromatografi med amberlite XAD-7HP kolonne</i>	77
6.2.2	<i>Gelfiltrering med Bio-Gel P-6 DG kolonne</i>	78
6.2.3	<i>Ionebytterkromatografi med ANX Sepharose 4 Fast flow</i>	79
6.3	BIOLOGISK AKTIVITET	81
6.3.1	<i>Komplementfikserende test</i>	81
6.3.2	<i>Antimikrobiell test</i>	84

6.3.3	<i>Påvirking på CYP3A4 + b5 - Metabolisme av midazolam.....</i>	87
6.3.4	<i>DPPH radikal scavenger aktivitet test</i>	89
6.4	KVANTITATIV OG KVALITATIV BESTEMMELSE AV KARBOHYDRAT	90
6.4.1	<i>Monosakkaridbestemmelse.....</i>	90
6.5	STRUKTUROPPKLARING.....	95
6.5.1	<i>Identifikasjon av AG-II med Yariv reagens test</i>	95
6.5.2	<i>Bindingsbestemmelse</i>	97
6.5.3	<i>Sammenheng mellom struktur og biologisk aktivitet.....</i>	103
7.	KONKLUSJON	104
8.	REAGENSliste	106
9.	KILDELISTE.....	108

1. Forkortelser

4-OH-Me-GlcA	4-OH-metyl-glukuronsyre
α	alfa indikere for at OH-gruppen ved C-1 er trans konfigurasjon til CH ₂ OH-substituenten ved C-5.
β	beta indikere for at OH-gruppen ved C-1 er cis konfigurasjon til CH ₂ OH-substituenten ved C-5.
μ l	Mikroliter
Ac	Acetylgruppe
AG-I	Arabinogalaktan type I
AG-II	Arabinogalaktan type II
Ara	Arabinose
Ara ^f	Arabinofuranose
Ara ^p	Arabinopyranose
C1-6	Karbonnummer 1-6 i et monosakkarid
Da	Dalton
f	Furanoseform, 5-ring
FID	Flammeionisasjonsdetektor
Fuc	Fucose
HGA	Homogalakturonan
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
ICH ₅₀	Konsentrasjon som gir 50 % hemming av hemolyse
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
Man	Mannose
Me	Metylgruppe
mM	Millimolar
MS	Massespektrometri
M _w	Molekylvekt

MWCO	Molecular Weight Cut-Off
N ₂	Nitrogengass
p	Pyranoseform, 6-ring
O ₂	Oksyngengass
OH	Hydroksylgruppe
PMII	En pektin fraksjon fra <i>Plantago major</i> L.
RG-I	Rhamnogalaktan I
RG-II	Rhamnogalaktan II
Rha	Rhamnose
rpm	Rotasjoner per minutt
T	Terminal
TMS	Tetrametylsilan
XGA	Xylogalakturonan
Xyl	Xylose

Fraksjoner fra svarsurbær

100V-Gel	Vanneluat fraksjonen etter gelfiltrering av 100V-Rå
100V-N	Nøytalt vanneluat fraksjonen fra ionebytterkromatografi av 100V-Gel
100V-Rå	100 °C vannekstrakt av residuet etter 50 °C vannekstraksjon
100V-S1	Første sure fraksjon isolert etter ionebytterkromatografi av 100V-Gel eluert med (0-2M) NaCl gradient. Fraksjonen er dialysert
100V-S2	Andre sure fraksjon isolert etter ionebytterkromatografi av 100V-Gel eluert med (0-2M) NaCl gradient. Fraksjonen er dialysert
100V-S3	Tredje sure fraksjon isolert etter ionebytterkromatografi av 100V-Gel eluert med (0-2M) NaCl gradient Fraksjonen er dialysert
100V-S4	Fjerde sure fraksjon isolert etter ionebytterkromatografi av 100V-Gel eluert med (0-2M) NaCl gradient. Fraksjonen er dialysert
50E-Amb	Vanneluat fraksjonen etter absorpsjonskromatografi av 50E-Rå
50E-Gel	Vanneluat fraksjonen etter gelfiltrering av 50E-Amb
50E-Met	Metanoleluat fraksjon etter absorpsjonskromatografi av 50E-Rå
50E-N	Nøytalt vanneluat fraksjonen fra ionebytterkromatografi av 50E-Gel
50E-Rå	50 % etanolekstrakt av residuet etter 96 % etanolekstraksjon

50E-S1	Første sure fraksjon isolert etter ionebytterkromatografi av 50E-Gel eluert med (0-2M) NaCl gradient. Fraksjon er dialysert
50E-S2	Andre sure fraksjon isolert etter ionebytterkromatografi av 50E-Gel eluert med (0-2M) NaCl gradient. Fraksjonen er dialysert
50E-S3	Tredje sure fraksjon isolert etter ionebytterkromatografi av 50E-Gel eluert med (0-2M) NaCl gradient Fraksjonen er dialysert
50E-S4	Fjerde sure fraksjon isolert etter ionebytterkromatografi av 50E-Gel eluert med (0-2M) NaCl gradient. Fraksjonen er dialysert
50V-Gel	Vanneluat fraksjonen etter gelfiltrering av 50V-Rå
50V-N	Nøytalt vanneluat fraksjonen fra ionebytterkromatografi av 50V-Gel
50V-Rå	50 °C vannekstrakt av residuert etter 50 % etanolekstraksjon
50V-S1	Første sure fraksjon isolert etter ionebytterkromatografi av 50V-Gel eluert med (0-2M) NaCl gradient. Fraksjonen er dialysert
50V-S2	Andre sure fraksjon isolert etter ionebytterkromatografi av 50V-Gel eluert med (0-2M) NaCl gradient. Fraksjonen er dialysert
50V-S3	Tredje sure fraksjon isolert etter ionebytterkromatografi av 50V-Gel eluert med (0-2M) NaCl gradient Fraksjonen er dialysert
96E-Rå	96 % etanolekstrakt av pulverisert bærmateriale

2. Sammendrag

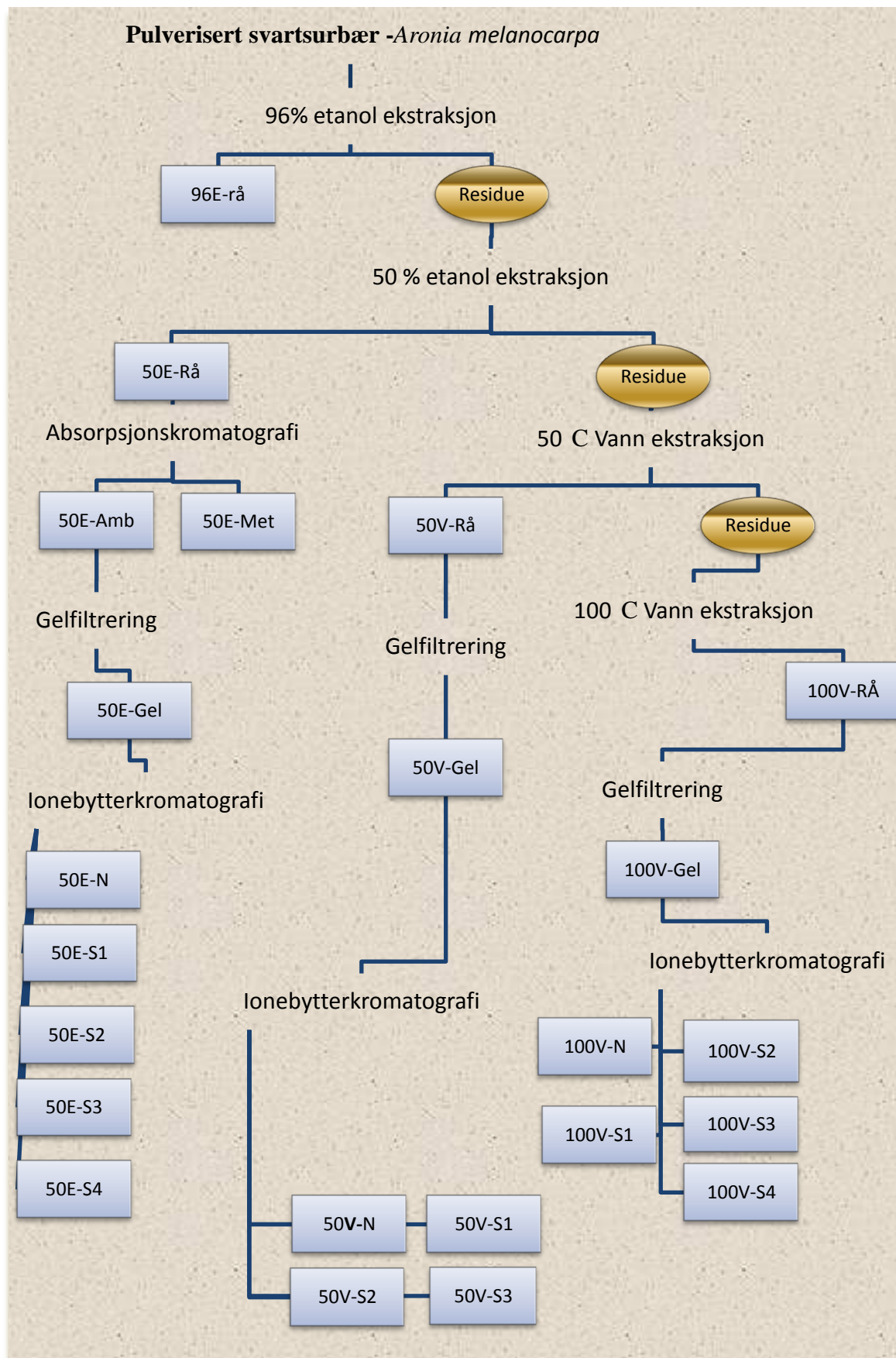
Aronia melanocarpa, svartsurbær har opphav fra Nord-Amerika. Bærene inneholder mye fenoliske substanser som for eksempel antocyaniner, og har høy antioksidant effekt sammenlignet med andre bær.

I denne studien ble det utført kjemisk og biologisk karakterisering av bæreekstrakter fra svartsurbær. Frosne bær fra ble preparert med diklormetan, så ekstrahert med etanol og vann. Ekstraktene ble rensert og fraksjonert med adsorpsjonskromatografi, gelfiltrering og ionebytterkromatografi. Totalt ble det samlet opp 23 fraksjoner. Disse fraksjonene er presentert på figur 2.1.

Fraksjonene ble testet for komplementfikserende og antimikrobielle effekt, i tillegg til CYP-hemmende og DPPH radikal scavenger aktivitet. Det ble også utført metanolyse for å bestemme karbohydratinnhold og karbohydratsammensetning. Tilstedeværelse av arabinogalaktan II ble identifisert med Yariv reagens test. Noen av fraksjonene ble også analysert for bindingsmønster ved hjelp av metyleringsanalyse.

Resultatene viser at fraksjonene 50E-Rå, 50E-Met, 100V-N og 100V-S1 hadde høyere komplementfikserende aktivitet enn PMII standarden. Antimikrobiell effekt mot *S. aureus* ble observert i fire av de testende fraksjonene, med størst effekt fra 50E-Rå og 50E-Met. Alle fraksjoner som ble testet for CYP hemmede effekt har vist aktivitet. Effekten var relativt høy for 50E-Rå og 50E-Met. De hemmet metabolismen av midazolam tilnærmet 100 % ved å påvirke CYP 3A4. Det ble også vist at 50E-Met og 50E-Rå har høy DPPH scavenger aktivitet, med IC_{50} -verdi på henholdsvis 12,5 og 17,7 $\mu\text{g/ml}$.

Metanolysesresultatene viser at de fleste fraksjoner hadde et karbohydratinnhold høyere enn 80 %, og de monosakkarider som ble funnet, er de monosakkaridene som ofte er tilstede i pektintype polysakkarider. Arabinogalaktan II ble også påvist i mange fraksjoner ved utfelling med Yariv reagens. Metyleringsresultatene kan tyde på at de seks fraksjonene (50E-Amb, 100V-N, 100V-S1, 100V-S2, 100V-S3 og 100V-S4) som ble analysert for bindingsmønster, kan ha innhold av pektintype polysakkarider. Basert på informasjonen om bindingsmønster, ser det ut som disse fraksjonene kan inneholde blant annet homogalakturonan, rhamnogalakturonan I, arabinogalaktan I og arabinaner.



Figur 2.1: Flytdiagram for opprensing og separering av råekstrakter fra svartsurbærmateriale. De firkantede rutene tilsvarende fraksjonene.

3. Innledning

3.1 Svartsurbær – *Aronia melanocarpa*

Aronia melanocarpa eller svartsurbær som den heter på norsk har opphav fra Nord-Amerika, hvor den ble kultivert som prydbusk. Rundt 1900-tallet ble planten innført i Øst-Europa og dyrket i daværende Sovjetunion inntil 2. verdenskrigen som en prydbusk, senere også i andre østeuropeiske land og Tyskland (Sabina & Harshadai, 2008).

I dag dyrkes det betydelige mengde bær i Øst-Europa med hovedvekt i Polen og Russland for kommersiell bruk, og har siden vært viktig i folkemedisin. Rundt Svartehavet dyrkes planten for helseeffekters skyld. I Norge dyrkes planten som enkeltbusk i bed, veiskråninger, hekk eller som ’’fyll’ i rundkjøringer og har vært kjent som en prydbusk fram til 1998. Nå dyrkes planten her i landet også for bærenes skyld. Det finnes produksjon av svartsurbær i Lier (Buskerud) og på Jæren (Rogaland) (Svendsen, 2006).



Rike	Planterike
Divisjon	Magnoliophyta
Klasse	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familie	Rosaceae
Slekt	Aronia
Art	<i>Aronia melanocarpa</i>

Figur 3.1: Bær sitter i klaser med røde stilker. Tabell 3.1: Taksonomisk klassifisering av svartsurbær (Wikipedia, 2009)

3.1.1 Botanikk

Svartsurbær er en løvfellende busk og tilhører rosefamilien. Busken har store hvite blomsterklaser fra mai til juni. Senere på sommeren kommer de mørkeblå eller svarte bær. Bærene har en diameter på ca. 8 mm, de sitter i klaser med røde stilker og henger godt lenger etter bladfall. Bladene er glinsende mørkegrønne, og når høsten kommer får de røde og oransje høstfarger. Busken er bred, noe overhengende, og kan bli opptil 3 m høy (Hjemstad, 2007).

I følge Norsk hageleksikon finner vi tre arter under slekten *Aronia*: *Aronia melanocarpa* (svartsurbær), *Aronia prunifolia* (blåsurbær) og *Aronia arbutifolia* (rødsurbær). Black chokeberry er det engelske navnet for svartsurbær. Navnet "chokeberry" fikk den, ettersom friske bær virker sammentrekkende på munnslimhinnene. De har en syrlig, ganske snerpete smak og ikke spesielt aromatisk. *Aronia* er gresk og står for *Mespilus* (mispel), som har vært kjent i oldtidens frukthager, men *melanocarpa* står for svarte bær (Svendsen, 2006).

3.1.2 Bruk

Indianerne i Nord-Amerika brukte både tørkede og friske bær som mat og medisin. De spiste friske bær rett fra busken. Mot forkjølelse drakk de te av dampede bær. Bærene inneholder garvestoffer som virket vevsadstringerende, de ble dermed brukt til sårbehandling av kolonister. Barken ble også benyttet til samme formål.

Svartsurbær er nå et stort helseprodukt i USA og Tyskland. I Europa og USA utvikles det stadig nye svartsurbærprodukter på grunn av sine antatte helsebringende effekter. I flere land lages det vin, sider og likører av svartsurbær. Russerne blander gjerne bærene med eplesaft og gjærer dette til en slags rødvin eller sider. I Litauen blir saften brukt til å lage dessertviner, ofte i blanding med andre bær eller frukter. I Norge finnes det juice med svartsurbær og andre frukter/ bær (Laupsa-Borge, 2005).

På grunn av den sterke og stabile fargen svartsurbær har, blir de brukt som tilsetningsstoff til svakfargete safter og matvarer. Fargen er så sterkt at den kan også bli brukt til farging av tekstiler. Andre hjemmelaget produkter av svartsurbær er juice, nektar, syltetøy, te og saft (Jurgonski et al., 2008).

3.1.3 Innholdsstoffer

Sammensetningen av svartsurbær er avhengig av mange faktorer som dyrking, modning, høsting og habitat. Bærene inneholder følgende:

Fenoliske substanser omfatter procyanidiner, antocyaniner og fenolisk syre, de utgjør 7,5 % av bærenes vekt. De er oftest forbundet med de medisinske egenskaper, som svartsurbær har. Procyanidiner er det dominerende fenoliske stoffet i svartsurbær. Stoffet foreligger ofte som oligomeriske eller polymeriske (- epi) catechiner. Antocyaniner er flavonoider, de gir bær den mørke fargen. De opptres som cyanidin glykosider: cyanidin 3-O-galaktosid (68,9 %), cyanidin 3-O-galaktosid (27,5 %), cyanidin 3-O-xylosid og cyanidin 3-glukosid (1,3 %). Mengde av fenoliske syre i svartsurbær er høy sammenlignet med andre bær.

Kostfiber i friske bær er ca. 5,6 % (w/w). Det er beskrevet at kostfiberpulver fra svartsurbær har innhold av mikrokrySTALLINSKE cellulose, pektiner, ligniner og konserverte tannin.

Organisk syre innhold er kun 1-1,5 % (w/w) i friske bær, er relativt lav sammenlignet med andre bær.

Sukkerinnhold er funnet å være mellom 16–18 % (w/w). Glukose og fruktose er identifisert, men ikke sukrose. Sorbitol brukes i spesielle dietter, og er kjent som et svakt laksativ stimulan. Den finnes i høy mengde i svartsurbær sammenlignet med andre bær.

Fett og protein utgjør henholdsvis ca 0,14 % og 0,7 % (w/w).

Mineraler som kalium, sink og tungmetaller (Pb og Cd) finnes i svartsurbærssaft.

Vitaminer B₁, B₆ og C, pantotensyre, niacin og β -karoten er også påvist.

Aromatiske substanser: Amygdalin, en cyanogen-glykosid som gir bitter smak, er identifisert i bærene. Dette stoffet har effekt mot kreft, kalles også for laetrile. Det er skrevet at ved hjelp av gasskromatografi og massespektrometri ble det påvist 48 flyktige komponenter i svartsurbær. De tre hovedkomponentene er benzaldehyd cyanohydrin, benzaldehyd og blåsyre. Andre benzenderivater med aromatiske egenskaper er benzylalkohol, salisylaldehyd, 2-fenylalkohol, fenylacetaldehyd, metylbenzoat, fenol, 4-methoxyacetophenone og 2-methoxyfenol osv (Sabina & Harshadai, 2008).

3.1.4 Effekter

Svartsurbær er en av plantene med rikest innhold av fenoliske substanser. Bær og antocyaninderivater fra svartsurbær har blitt studert intensivt i de siste 15 årene. De effekter som svartsurbær har, er ofte assosiert med den høye antioksidant aktivitet til fenoliske substansene (Valcheva-Kuzmanova & Belcheva, 2006).

Antioksidant aktivitet

Det er skrevet at ferske svartsurbær har stor antioksidant kapasitet. Saften har en antioksidant kapasitet, som er fire ganger større enn saftene fra blåbær og tranebær eller rødvin, som også er veldig rike på fenoliske substanser. Basert på data fra in vitro test "ORAC = Oxygen radikal absorbance capacity" anslår man at antocyaniner i ferske bærene utgjør 33 % av den totale antioksidant aktivitet som svartsurbær har. Men procyanidiner står for om lag samme eller høyere antioksidant aktivitet enn antocyaniner. Både procyanidinene og antocyaninene har O-dihydroksylfenyl gruppe som kan danne kompleks med jern (II) og kobber (II). Kompleksdannelsen hindrer disse metallene å katalysere frie radikalreaksjoner i biologisk system, noe som kan redusere graden av prooksidativ aktivitet.

Antioksidant aktivitet fra in vivo dyremodeller er også blitt beskrevet. I disse modellene er det vist at antocyaniner fra svartsurbær reduserer lipidperoksidering. I tillegg har det også vist en forbedring av aktiviteten til enzymer som deltar i antioksidant forsvarssystemet (Sabina og Harshadai 2008). I en annen studie ble det rapportert at et metanolekstrakt fra svartsurbær, kalt rød pigment fraksjon, har antioksidant aktivitet både in vitro og in vivo. Denne fraksjonen består hovedsakelig av cyanidinderivater, og er regnet som en potent scavenger av 1,1-diphenyl -2-picrylhydrazyl (DPPH) radikal. Med en konsentrasjon på 25 µg/ml har fraksjonen vist å kunne scavenget mer enn 44 % DPPH radikaler i in vitro DPPH-test. I studien ble det også utført en in vivo test, der noen rotter fikk og andre ikke fikk fraksjonen før de ble gitt etanol. Hos rottene som bare fikk etanol, ble det dannet det "oksygenradikal" som gav blødning og sår i magen. Men de rottene som fikk denne fraksjonen i tillegg, viste signifikant forebygging av gastriske slimhinneskader. Mekanismen bak denne effekten kan være at cyanidinderivater har scavenget oksygenradikalene, ettersom hemming av gastrisk syresekretasjon ikke ble observert med den røde pigment fraksjonen (Matsumoto et al., 2004).

Hemming av kreftcelle proliferasjon

Det er beskrevet at bær og saften fra svartsurbær har vist antiproliferativ eller beskyttende effekt mot kolonkreft i in vitro studier og i en dyrestudie. Et antocyaninrikt ekstrakt fra svartsurbær har vist å hemme veksten samt stimulere apoptose av human HT-29 kolonkreftceller. Det er skrevet også at svartsurbærekstrakt hemmet veksten av kreftceller i større grad enn druer og blåbærekstrakt, som også er rike på antocyaniner. I tillegg er det beskrevet at svartsurbær har vist antikarsinogen effekt i en dyrestudie. Der hannrotter først fikk kolonkarsinogenet "azoxymetan", så antocyaninrikt ekstrakt fra svartsurbær. Det ble vist at dette ekstraktet hemmet dannelsen av "azoxymethane-induced aberrant crypt foci", en tentativ markør for dysplasi og malign transformasjon, og reduserte dermed proliferasjonshastighet til kolonepitelcellene (Sabina & Harshadai, 2008).

Antimutagen effekt

I en in vivo Amest test, der benzo[a] pyren og 2-aminofluoren som har høy mutagen effekt ble brukt som reagenser. Antocyaniner isolert fra svartsurbær hemmet effektene til benzo[a] pyren og 2-aminofluoren betydelige i testen. Studien konkluderte dermed at antocyaniner isolert fra svartsurbær kan ha antimugen effekt (Gasiorowski et al., 1997).

Leverbeskyttende effekt

I en dyrestudie ble det vist at antocyaniner fra svartsurbær reduserte toksisitet og akkumulering av kadmium i lever og nyre hos rotter, som fikk kadmium i dietten. Effekten kan være at antocyaniner band til kadmium og reduserte dermed den negative effekten av metallionet. En annen leverbeskyttende effekt av svartsurbærsaft ble også observert hos rotter som fikk karbontetraklorid (CCl₄), et stoff som forårsaker akutt levercytotoksitet. Cytokrom P450 enzymer i rottelever omdannet CCl₄ til det frie radikalet triklorometyl (CCl₃), som sammen med oksygen initierte lipidperoksidasjon, dette resulterte i levercytotoksitet. Antocyaniner og/eller andre fenoliske substanser i svartsurbærsaften har evne til å scavengere radikalet CCl₃, og ble dermed antatt for være ansvarlige for denne leverbeskyttende effekten (Sabina & Harshadai, 2008).

Karbeskyttende effekt

Det er beskrevet at svartsurbær kan virke positivt på enkelte risikofaktorer ved hjertekarsykdom. I en in vitro forsøk ble det observert at fenoliske substanser fra svartsurbær bidrar til beskyttelse og gjenoppbygging av endotelceller og dermed deres

funksjon. I en annen eksperimentell modell av hyperlipid hos rotter, ble det vist at svarturbærsaft hindret økning av total kolesterol-, LDL-kolesterol- og lipidkonsentrasjon i plasma, som var induisert av mat.

Regulert inntak av svartbærsaft (250 ml pr. dag) i seks uker hos menn som hadde mild hyperkolesterolemi, ble det vist en signifikant reduksjon av totale kolesterol-, LDL-kolesterol- og triglyseridkonsentrasjon i serum, i tillegg til en økning i HDL2 kolesterol-konsentrasjon. En moderat, men signifikant reduksjon av serum glukose, homocystein og fibrinogenkonsentrasjon ble også observert. Det ble også observert reduksjon i systolisk og diastolisk blodtrykk med et gjennomsnitt på henholdsvis 13 og 7 mm Hg. En liknende antihypertensjon effekt ble observert hos pasienter som fikk flavonoidrikt ekstrakt fra svarturbær. Dette gjelder pasienter etter myokardinfarkt, pasienter som behandles med statiner og pasienter med diabetes mellitus type II (Sabina & Harshadai, 2008).

Antidiabetes effekt

Det er beskrevet at antocyaniner fra svarturbær er nyttig i forebyggende og behandling av diabetes mellitus type II og diabeteskomplikasjoner. Reduksjon i hypertriglyseridemi og hyperglykemi ble observert i en dyrestudie, der diabetiske rotter fikk svarturbærsaft. I en human intervensjon med daglig inntak av svarturbærsaft (200 ml) over 3 måneders periode, ble det observert en effektiv reduksjon av glukosekonsentrasjon hos fastende pasienter med ikke insulinavhengig diabetes. Nyere humanstudier har også beskrevet at svarturbærsaft kan være nyttig i behandlingen av fedme (Sabina & Harshadai, 2008).

Antibakteriell og antiviral effekt

Det er beskrevet at svarturbærsaft har bakteriostatisk effekt mot *S. aureus* og *E.coli* i in vitro forsøk. Target for flavonoid reaksjon er mikroorganismers membraner. I tillegg er det også beskrevet at svarturbærsaft har antiviral effekt mot Influenta virus type A. I en studie ble det vist at inkubasjon av svarturbærsaft sammen med virussuspensjon førte til reduksjon av virusets hemagglutinasjon. Det er antatt at fenoliske stoffer (antocyaniner) i saften dannet en kompleks med virion (viruspartikkel), og hindret dermed virus å absorbere til celleoverflaten (Valcheva-Kuzmanova & Belcheva, 2006).

Uønskelige og toksiske effekter

Inntil 2006 er det ikke funnet noen litteraturer, som tilsier at svarturbærsaft, bær eller ekstrakt har uønskelige eller toksiske effekter (Valcheva-Kuzmanova & Belcheva, 2006).

3.2 Medfødt og ervervet infeksjonsforsvar

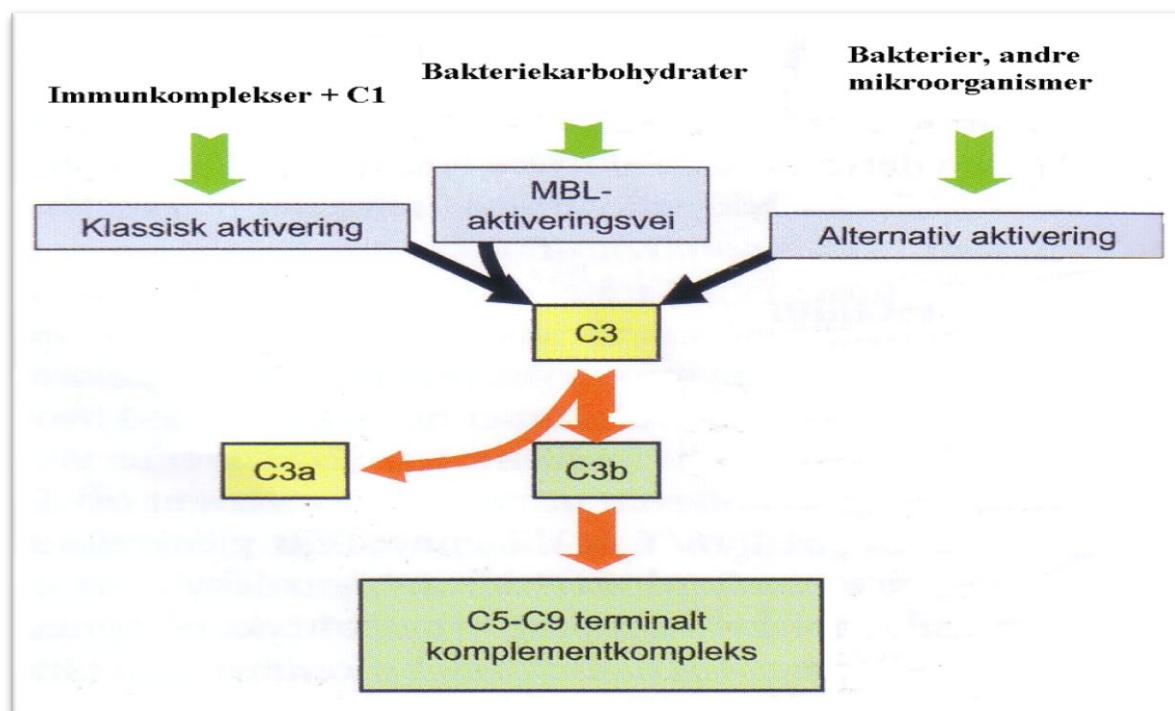
Menneskets kropp blir stadig forsøkt invadert av infeksjøs mikroorganismer, som bakterier, virus, sopp, protozoer og helminter. Hvis kroppen vår ikke hadde et forsvar, ville den vært et lett bytte for disse mikroorganismene. Vårt beskyttende forsvar består av 1. det medfødte (nedarvet) og 2. det ervervede (tillært) immunforsvar. Dette forsvaret verner kroppen mot infeksjoner, og fjerner skadde/ syke og døde celle.

Det medfødte immunforsvaret er nedarvet og trer i funksjon første gang kroppen kommer i kontakt med mikroorganismer. Forsvaret aktiveres hurtig og reagerer forholdsvis uspesifikt mot de fleste patogene fremmedlegemer. Til gjengjeld er det medfødte immunforsvaret bare aktivt over et relativt kort tidsrom og kan dessuten overlistes av enkelte patogener. Serumproteiner, kalt komplementsystem og celler som makrofager og granulocytter er hovedaktørene i det medfødte immunforsvaret. Makrofager og granulocytter har evne til å fagocyttere fremmedlegemer, men aktivering av det komplementsystemet fører til at bakteriene lyses og elimineres.

Det ervervede immunforsvaret utvikleres først etter kontakt med mikroorganismer og har tre kjennemerker: spesifisitet, hukommelse og toleranse. Det ervervede immunforsvaret har derfor en spesifikk, målrettet immunrespons som går på den enkelte bakterie og virus. B-lymfocytter og T-lymfocytter er antigen spesifikke celler, de utgjør hovedbestanddel i dette forsvaret. B-cellene er ansvarlige for antistoffproduksjon, mens T-cellene dreper virusinfiserte celler og stimulerer makrofagene til å drepe bakterier (Borgen & Munthe, 2007).

3.2.1 Komplementsystem

Komplementsystemet er viktig for medfødt og ervervet bekjempelse av infeksjoner. Systemet består av over 20 serumproteiner, 9 av disse (C1-C9) er komplementproteiner men resten er deres regulatorer. Normalt forligger disse proteinene i hvilende form og kan bli aktivert via tre forskjellige veier (Yamada & Kiyohara, 1999).



Figur 3.2: Komplementsystemet kan aktivere via tre veier: Klassisk aktiveringsvei, lektin aktiveringsvei og alternativ aktiveringsvei (Bogen & Munthe, 2007).

1. Klassisk aktiveringsvei

Den klassiske aktiveringsveien igangsettes ved at IgM- eller IgG-antistoffer først binder seg til antigener, så aktiverer de det første komplementproteinet C1. Dette proteinet spalter C4-komplementprotein til C4a- og C4b-fragment. C2-komplementprotein binder seg til C4b-fragmenten og blir spaltet av det aktive C1. Spaltingen resulterer i C4b2a-komplekset, som igjen spalter C3-komplementprotein til to fragmenter, C3a og C3b. Noen C3b-fragmenter forblir bundet til C4b2a-komplekset og kalles nå for C5-konvertase. Denne konvertasen spalter så C5-komplementprotein til en liten C5a-fragment og en stor C5b-fragment. C5b-fragmenten binder seg til komplementproteiner C6 og C7 og danner C5b67-kompleks. Dette komplekset slår seg ned i cellemembranen og tillater komplementproteiner C8-9 å binde seg til, noe som induserer dannelse av det terminale komplementkomplekset.

2. Lektin aktiveringsvei

Lektin aktiveringsveien aktiveres av karbohydratstruktur fra mikroorganismer, og ligner mye på den klassiske aktiveringsveien. I motsetning til den klassiske aktiveringsveien som er utløst av antistoff, er det mannosebindende lektin som trigger kaskade i lektin aktiveringsveien.

3. Alternativ aktiveringsvei

Den alternative aktiveringsveien utløses uavhengig av antistoffbinding til antigener.

Mekanismen initieres når komplementproteinet C3 reagerer med vann og aktiveringskaskaden forsetter bare dersom dette skjer i nærheten av en fremmed overflate, som f. eks kan være en overflatebestanddel på bakterier.

Selv om disse tre aktiveringsveiene er utløst av ulike faktorer, er resultatet likevel det samme, nemlig det terminale komplementkomplekset. Dette komplementkomplekset forårsaker membranskade og inflammasjon, noe som fører til drap av mikroorganismer ved infeksjoner, vevsskade ved autoimmune sykdommer og andre inflammatoriske tilstander (Borgen & Munthe, 2007).

3.3 Karbohydrat

Ordet ”karbohydrat” eller hydrat av karbon, er utledet fra den generelle formelen $C_x(H_2O)$. Karbohydrater er også kjent som sakkarider eller sukre, finnes i rikelige mengden i naturen, både i planter og dyr. For levende organismer er karbohydrat en viktig energikilde, og er viktige bestanddeler i cellekjerne, cytoplasma og cellevegg. Sist men ikke minst er karbohydrater betydningsfulle i forbindelser med utvikling av matprodukter, tekstilmaterialer og farmasøytiske produkter. Karbohydrater er definert som polyhydroksyl-aldehyder- eller ketoner, eller forbindelser som ved hydrolyse gir slike polyhydroksyl-aldehyder- eller – ketoner. Karbohydrater kan deles inn i tre grupper:

1. De lavmolekylære forbindelser

Denne gruppen består av monosakkarider og disakkarider.

Monosakkarider er polyhydroksyl- aldehyder /ketoner som bestående av 3-9 C-atomer. De er enkle sukkene. Monosakkarider foreligger ofte i sykliske hemiacetal-form og klassifiserer som ketoser eller aldoser, siden de bærer henholdsvis en aldehydgruppe eller en ketogruppe. Fordi monosakkarider har et kiralt senter kan de opptre både som D og L-enantiomer. D-enantiomeren forekommer mest i naturen. Monosakkarider kan også eksistere i to ringformer, pyranoseform og furanoseform, som er henholdsvis seksring og femring.

I ringstrukturen kan hydroksylgruppen i C-1 hos aldoser eller i C-2 hos ketoser

peke i to forskjellige retninger, oppover eller nedover i forhold til ringens plan, og resulterer dermed i en β -konformasjon eller en α -konformasjon. Flere monosakkarider kan binde sammen ved hjelp av glykosidbindinger, og danner da disakkarid eller polysakkarider. Et disakkarid har to monosakkaridenheter.

2. De intermediærmolekylære forbindelser

Denne gruppen omfatter oligosakkarider. I følge av International Union of pure and Applied Chemistry (IUPAC) har oligosakkarider 3-9 monosakkaridenheter. Et eksempel på et oligosakkarid er raffinose, en trisakkarid bestående av galaktose, fruktose og glukose. Dette oligosakkaridet er rikelige distribuert i mange planter (Izydorczyk, 2005).

3. De høymolekylære forbindelser.

Polysakkarider tilhører denne gruppen, de er høymolekylære polymere, og kalles også for glykaner. De består av varierende antall monosakkaridenhet, ofte fra 100 til noe hundre tusen enheter. Kun et fåtall av polysakkarider har færre enn 100 monosakkaridenheter.

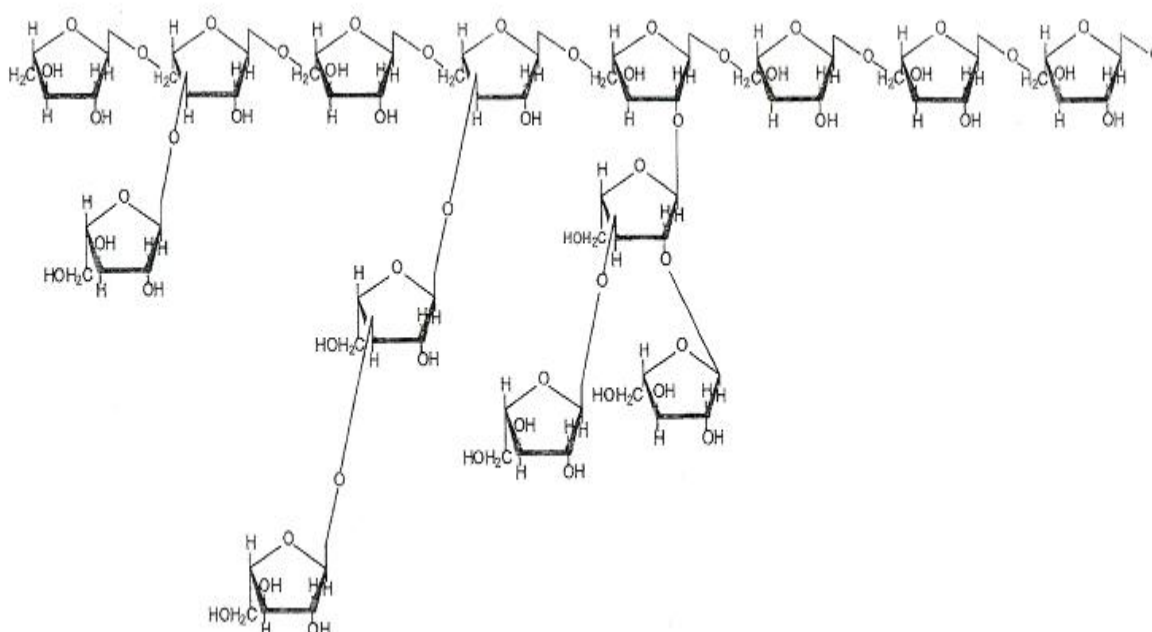
I planter forligger polysakkarider i forskjellige former, og er tilstedet i alle organer både i og utenfor celler. Strukturelt sett er polysakkarider en heterogen forbindelse. De kan være nøytrale, sure, lineære eller forgrenete samt være substituert med forskjellige typer organiske grupper som metyl og acetylgrupper. Polysakkarider som består av monosakkarider uten ladning er kjent som nøytrale polysakkarider. Polysakkarider som inneholder uronsyrer, har negativ ladning og kalles for sure polysakkarider. Hittil er det bare funnet et polysakkarid (kitosan) med positiv ladning.

Et polysakkarid er et homopolysakkarid hvis de er sammensatt av bare en type monosakkarid, og er det sammensatt av flere ulike typer monosakkaridenheter kalles det for heteropolysakkarid. Basert på monosakkaridsekvensen i et polysakkarid, kan også polysakkaridet inndeles i tre ulike typer: 1) periodisk type, hvor monosakkaridenheter forligger i et repeterende mønster, 2) avbrytelse type, hvor kjeden har en repeterende sekvens av monosakkarider, separert av en ikke- repeterende sekvens, 3) aperiodisk type, hvor polysakkarider har irregulære sekvenser av monosakkaridenheter, binding posisjon og konfigurasjon (Izydorczyk, 2005; Paulsen & Barsett, 2005).

3.3.1 Polysakarider i planter

Arabinaner

Avhengig av opphav kan arabinaner være lineære eller forgrenede. Hovedkjeden består ofte av 1,5-bundet α -L-arabinofuranoseenheter med forgreiningspunkter på posisjoner C-3 eller C-2. Sidekjedene består ofte av 1-3 arabinoseenheter. I naturen er arabinaner ofte kovalent bundet til galakturonsyrikerike polymere. De kan lett frisettes fra polymeren enten ved enzymatisk reaksjon eller svak syrehydrolyse. Det har vært beskrevet at arabinaner finnes i cellevegg fra eple, sukkerrør, gulrot, løk, soyabønne og andre (Paulsen & Barsett, 2005; Schols & Voragen, 2002).



Figur 3.3: Skjematisk struktur av forgrenet α -L(1,5)-arabinan (Schols & Voragen, 2002).

Arabinogalaktan (AG)

AG kan grupperes i tre typer:

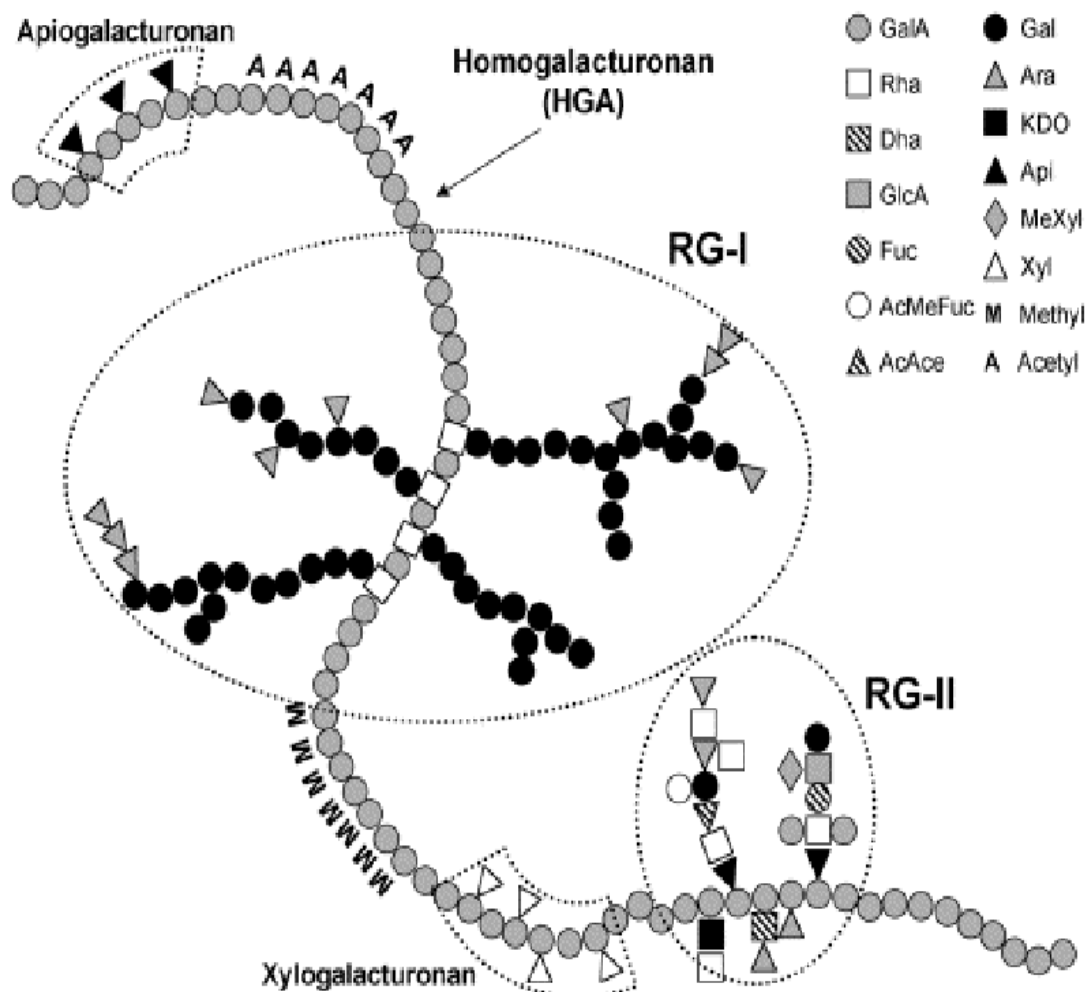
Arabino-4-galaktaner type I (AG-I), arabino-3,6-galaktaner type II (AG-II) og polysakkarider med arabinogalaktan sidekjetter (Yamada & Kiyohara, 2007).

1. Arabinogalaktan type I (AG-I)

AG-I finnes i plantecelleveggen i varierende mengde. Den har en lineær hovedkjede består av 1,4-bundet- α -D-galaktopyranoseenheter. Sidekjedene består av arabinaner og er bundet til C-3 på galaktoseenheter i hovedskjeden. Substitusjonen med β -galaktose til C-6 på galaktoseenheter i hovedkjeden kan også forekomme (Schols & Voragen, 2002).

3.3.2 Pektintype polysakkarider

Begrepet pektinsyrer eller pektiner brukes til å beskrive polymerer, som består av galakturonsyreenheter. De finnes stort sett i primær cellevegg, midtlamellen og mellom celler hos de fleste planter. Her deltar de i mange av celleveggenes funksjoner som ionetransport og vannretensjon, de inngår også som strukturelle materiale i celleveggen som celledørrelse, form, styrke og porestørrelse. I tillegg er de involvert i plantens forsvarmekanisme mot infeksjoner, sår og stress. Tidligere ble det trodd at pektinsyrer eller pektiner hovedsakelig bestod av syrer, men etter hvert er det vist at de er en veldig kompleks polysakkaridgruppe. Den dominerende sukkerenheten i pektin eller pektinsyrer er D-galakturonsyre, enhetene foreligger som 1,4-bundet- α lineær kjede med varierende metylforesteringsgrad (30–80 %). Pektinkomplekset kan deles inn i tre hovedområde (Schols & Voragen, 2002; Paulsen & Barsett, 2005).



Figur 3.6: Skjematisk struktur til pektintype polysakkarider (Perez et al., 2003).

1. Homogalakturenan (HGA)

HGA er en lineær homopolymer, og består av 1,4-bundet- α -D-galakturensyreenheter. Dette området kalles for "glatt region", fordi det har en lang sekvens av homogalakturensyreenheter uten sidekjeder. HGA er delvis metyl-esterifisert på C-6. Acetyl-esterifiseringen på C-3 kan også forekomme. Graden av metyl-esterifisering (DM) uttrykkes som antall mol av metanol som er tilstede i pr.100 mol galakturensyre. Pektiner med DM lik eller større enn 50 er høymetoksylert (HM), men de med DM mindre enn 50 er lavmetoksylert (LM) pektiner (Schols & Voragen, 2002; Paulsen & Barsett, 2005).

2. Rhamnogalakturenan I (RG-I)

RG-I er en generell betegnelse for pektinmolekylregioner med rikt innhold av rhamnose og galakturensyreenheter. Hovedkjeden består av vekselvis 1,2-bundet- α - L-rhamnose og 1,4-bundet- α - D-galakturensyre. Avhengig av opphavet til celleveggen, kan 20–80 % av rhamnoseenhetene i hovedkjeden ha sidekjeder bundet i C-3 og/eller C-4. Lengden til disse sidekjedene varierer fra 1-50 enheter og består av nøytrale sukre som galaktose, arabinose eller arabinogalaktaner. RG-I kalles også for "hårete region". Denne regionen er estimert for å være det aktive setet for antikomplementær aktivitet. Hårete regioner er adskilt med glatte regioner (HGA), og andelen av hårete og glatte regioner kan variere avhengig av plantevev og plantens utviklingsfase. Arabinogalaktaner bundet til RG-I er ofte AG-II, men AG-I kan også forekomme (Schols & Voragen, 2002; Paulsen & Barsett, 2005).

3. Rhamnogalakturenan II

RG-II ble først funnet i en plantecellevegg, og utgjør bare en liten del av pektinkomplekset. RG-II inneholder ikke rhamnose i hovedkjeden som navnet tilsier. Hovedkjeden består av 9-10 1,4-bundet- α - D-galakturensyreenheter og har fire ulike oligosakkarider bundet til galakturensyre i C-3 eller C-4. Oligosakkaridene som finnes her inneholder sjeldne sukkene som apiose, acesyre, 3-deoksy-D-lykso-2-heptulosasyre (DHA), 2-O-metylfucose, 2-O-metylxylose og 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulosonsyre (KDO), og de er kjennetegnet for dette RG-II området. RG-II isolert fra rødvin ved fermentering gir både monomeriske og dimeriske substanser. Grunnen kan være at RG-II inneholder atypiske monomere og oligomere, noe som gjør at de naturlige og vanlige enzymer ikke kan spalte dem fullstendige. Frem til 2003 er det rapportert at 29 forskjellige planter har RG-II med temmelig lik struktur, noe som kan tyde på at strukturen er ganske konserverert (Paulsen og Barsett 2005, Schols og Voragen 2002).

3.4 Cytokrom P450

Cytokrom P450-enzym er en enzymgruppe bestående av hemoproteiner. De er kroppens viktigste legemiddelmetaboliserende enzymer. Hittil er det beskrevet ca. 60 forskjellige CYP-enzymmer hos mennesker. Nomenklatur for disse enzymene starter med ordet "CYP" etterfulgt av et tall som betegner genfamilie, deretter en bokstav som står for subfamilie og et avsluttende tall som angir det enkelte enzymet (f.eks. CYP3A4).

De enzymene som er ansvarlige for legemiddelmetabolisme finnes stort sett i lever og tarmvegg. De metaboliserer mer enn 50 % av alle legemidler som menneske inntar. Enzymer CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 og CYP1A2 er antatt for å være de viktigste legemiddelmetaboliserende enzymene. De omdanner som regel legemidler til inaktive eller aktive vannløselige metabolitter ved å katalysere en oksidasjon. Andre enzymer kan ha en fysiologisk funksjon (Molden & Skymoen, 2004/2005).

En rekke forbindelser kan påvirke aktiviteten til disse legemiddelmetaboliserende enzymene. Interaksjonen oppstår når en substans som påvirker aktiviteten til et CYP-enzym, er kombinert med et legemiddel som metaboliseres av det samme enzymet. Utfallet kan være nedsatt terapeutisk effekt, dersom et legemiddel har fått sin metabolisme induisert. Utfallet kan også være økt risiko for bivirkninger og toksisitet, hvis legemidlet har fått sin metabolisme hemmet.

I noen tilfeller kan utfalle være så alvorlige som hjerterytmeforstyrrelser ved f. eks kombinasjonsbehandling med erytromycin og terfenadin. Andre tilfeller er manglende graviditetsbeskyttelse av p-piller ved samtidig behandling med karbamazepin eller fenytoin. Johannesurt (et naturlegemiddel), som er en kratig induktor av enzymer CYP3A4 og CYP2C9, kan forårsake behandlingsvikt, dersom den kombineres med ciclosporin (releksjon etter organtransplantasjon), antiv-Hiv-midler (forverring Hiv-infeksjon) eller warfarin (nedsatt antikoagulasjonseffekt) (Spigset, 2001).

Frukt og bær kan også påvirke legemiddelmetabolisme. En studie har vist at inntak av 250 ml grapefruktjuice om dagen hemmer enzymet CYP3A4 i omtrent samme grad som 1 gram erytromycin daglig. Andre frukter og bær kan også ha innvirkning på legemiddelmetabolismen, men her dokumentasjonsgrunnlaget svært begrenset (Molden & Spigset, 2007).

4. Oppgavens mål

Målsettingen for denne oppgaven er firedelt.

1. Frosne svartsbær skal prepareres og ekstraheres.
2. Råekstrakter skal deretter renses og fraksjoneres på grunnlag av molekylstørrelse og ladning.
3. Både fraksjoner med lavmolekylære substanser og fraksjoner med høymolekylære substanser skal analyseres med tanke på mulige biologiske aktiviteter.
4. Karbohydratinnhold og karbohydratsammensetning i de ulike fraksjonene skal bestemmes. Utvalgte polysakkaridfraksjoner skal strukttuoppklares.

5. Metoder

5.1 Generelle metoder

5.1.1 Vannkvalitet

Destillert vann fra Elix[®] millipore Progard[®]2 w/o polyfenol filter ble brukt i alle metoder. Til gelfiltrering og ionebytterkromatografi ble vannet i tillegg degasset ved hjelp av heliumgass.

5.1.2 Innveiging

Analysevekt: BP 221S (Sartorius)

Skålvekt: CT 1200V (OHAUS[®] corporation)

5.1.3 Sentrifugering

Løsninger ble sentrifugert i Multige 4KR (Heraeus Sepatech) for å lette filtrering og separasjon.

5.1.4 Blanding av løsninger

Løsninger ble blandet på Whirlimixer (Fisons) eller MS2 Minishaker (IKA).

5.1.5 Filtrering

Store væskemengder ble filtrert med nutsalp, vannstrålepumpe og en av følgende filter:

- Filter papir: Whatman[®] Qualitative 1 (Schleicher & Schuell)
- Glassfiberfilter: Whatman[®] Glass-micro fibre 150 mmø GF/F (Schleicher & Schuell)

Små væskemengder ble filtrert med sprøyte og mikrofilter:

- Mikrofilter: Acro[®]50A Filter Device with 5µm Versapor[®] membrane, Non-sterile (Life Sciences)

5.1.6 Degassing/Ekvakuering av luft

Fjerning av O₂/luft fra løsninger ble utført i ca. 15 minutter ved fortregning med heliumgass, eller ved hjelp av vakuum fra vannstråle pumpe.

5.1.7 Oppkonsentrering

Prinsipp

Noe ganger er det ønskelig å fjerne alt eller deler av løsemiddelet. Dette gjøres for å oppnå en oppkonsentrering av stoffet i løsningen, lette frysetørking eller fjerning av uønskkelige løsemidler.

Utstyr

- Rundkolbe
- Rotavapor: RE (Büchi)

Prosedyre

Løsning ble overført over en rundkolbe. Så ble løsningen oppkonsentrert på rotavapor under vakuum. Dette foregikk under rotasjon ved < 40 C° i destillert vann.

5.1.8 Absorbansmålinger

Absorbansmålinger ble utført i forbindelse med fenol-svovelsyretest. Microplate reader 3550 (BioRad) ble benyttet.

5.1.9 Frysetørking

Prinsipp

Vann i løsningen ble frosset og fjernet ved sublimasjon. Hensikten med metoden er å bestemme mengde tørrstoff i en løsning, og/eller for å kunne oppbevare det tørkede stoffet til senere forsøk.

Utstyr

- Metanolbad: Hetofrig (Heto Birkerød)
- Frysetørker: Alpha 1-4 (Christ)

Prosedyre

- a. Rundkolbe ble tarert
- b. En gitt mengde av en løsning ble overført til rundkolben og frosset ned under rotasjon i metanolbad ved $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- c. Rundkolben med den frosne løsningen ble plassert i eller utenpå frysetørkeren under vakuum i ca. 24–48 timer.
- d. Etter tørkingen ble mengden av stoffet i løsningen veid.
- e. Tørrstoffet ble oppbevart til senere bruk.

5.1.10 Vask av dialyseslanger**Prinsipp**

Dialyseslanger kan inneholde rester av cellulose. For å fjerne cellulose ble slangene vasket før bruk.

Reagenser

- 2 % natriumhydroksidløsning (AnalaR)
- 0,05 % natriumazidløsning (Merck)

Utstyr

- Dialyseslanger spectra/Pro, MWCO 3.500 Daltons, d: 29 mm
- Kokeplate, bøtte og glasstav

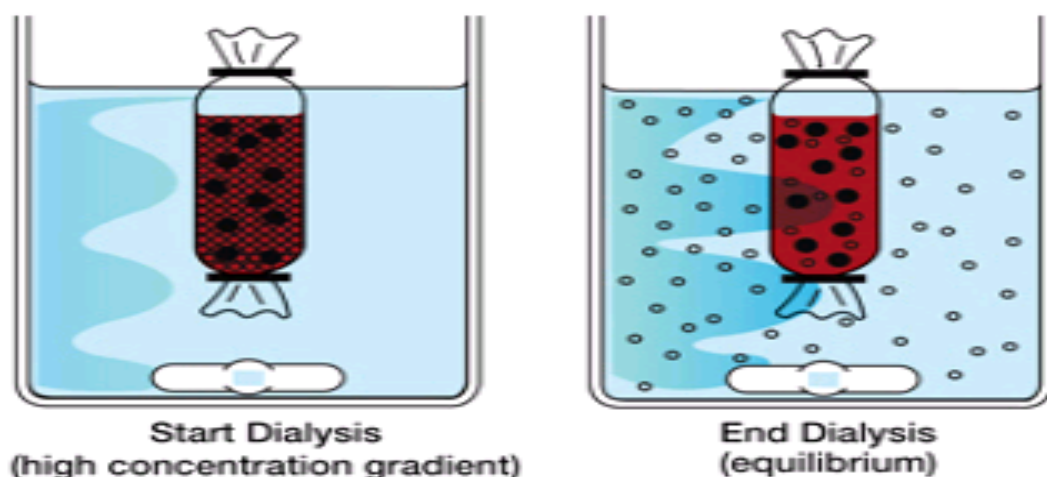
Prosedyre

- a. Dialyseslangene ble klippet i ønsket lengde ca. 70 cm.
- b. Slangene ble vasket først med springvann og deretter med destillert vann både innvendig og utvendig.
- c. Slangene ble kokt 2 % natriumhydroksidløsning i 10 minutter. Så ble de skylt med springvann og destillert vann både innvendig og utvendig.
- d. Deretter ble slangene kokt i destillert vann i 10 minutter.
- e. Slangene ble skylt ekstra godt med destillert vann både innvendig og utvendig.
- f. Slangene var nå klar for bruk.
- g. Slangene som ikke ble tatt i bruk med en gang, ble oppbevart i 0,05 % natriumazidløsning ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for å hindre bakterievekst.

5.1.11 Dialyse

Prinsipp (Spectrum[®] Laboratories inc, 2009)

Dialyse utføres for å fjerne uønskete lavmolekylære forbindelser og salter fra prøveløsningen. Prosessen går ut på at oppløste molekyler diffunderer over en semipermeabel membran og til en annen løsning med lavere konsentrasjon. Membranen til en dialyseslange har porer med en bestemt cut-off-verdi. Forbindelser i dialyseslangen med en molekylvekt lavere enn denne cut-off-verdien, vil diffundere ut i omkringværende væske på grunn av konsentrasjonsforskjeller. Som figur 5.1 viser, vil diffusjon skje inntil likevekt er oppnådd. For å opprettholde en konsentrasjonsforskjell, må vannet utenfor membranen skiftes ofte.



Figur 5.1: Dialyseprosess, der forbindelser i en dialyseslange diffunderer ut i omkringværende væske på grunn av konsentrasjonsforskjeller. Diffusjon skjer inntil likevekten er oppnådd..

Reagenser

- 10 % (mettet) sølvnitratløsning (Merk)
- Toluenløsning (FI)

Utstyr

- Dialyseslanger spectra/Pro, MWCO 3.500 Da, d:29 mm
- Glasstav
- Dialyseklyper
- Bøtter, magnet og magnetrører

Prosedyre

- a. Dialyseslangene ble lukket med en klype i den ene enden.
- b. Slangene ble fylt halvfulle med prøveløsning. Noen dråper toluenløsning ble tilsatt i dialyseslangene før den andre enden lukkes.
- c. Dialyseslangene ble satt i en bøtte med destillert vann.
- d. Det ble brukt 3 glasstaver i hver bøtte for å holde dialyseslangene unna magneten. Vannet i bøttene ble byttet flere ganger under dialysen.
- e. Dialysen ble avsluttet når 2 ml av dialysevannet ikke lenger ble blakket av en dråpe 10 % sølvnitratløsning. Dialysen tok 4 døgn.
- f. Løsninger fra hver slange ble overført til hver sin tarert kolbe.
- g. De ble så oppkonsentrert til et mindre volum på rotavapor.
- h. Deretter ble de frysetørket.

5.1.12 Syrevasking av glassutstyr**Prinsipp**

Glassutstyr kan være kontaminert av polysakkarider og kan påvirke karbohydratanalysen.

Alt glassutstyr som ble benyttet til metanolyse og metylering ble syrevasket.

Polysakkarider spaltes først ved hjelp av konsentrert saltsyre og skylles deretter vekk med destillert vann.

Reagenser

- Konsentrert saltsyre (Prolabo)

Utstyr

- Beger
- Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments)

Prosedyre

- a. Glassutstyret ble fylt/dekket med konsentrert saltsyre og satt til henstand i 30 minutter.
- b. Glassutstyret ble skylt grundig med springvann og deretter med destillert vann.
- c. Glassutstyret ble så tørket i varmeskap på 80 °C.

5.2 Preparering og ekstraksjon av bærmateriale

5.2.1 Preparering av svarsurtbærmateriale

Prinsipp

Preparering av bærmaterialet bestod av ekstraksjoner med diklormetan og 96 % etanol. Ekstraksjonen var basert på ”lik liker lik-prinsipp”. Diklormetan trakk ut de mest upolare forbindelser, samt at bærmaterialet ble avfettet. Mens 96 % etanol trakk i tillegg ut en del vann fra bærmaterialet, noe som lettet både tørking og pulverisering av bærmaterialet.

Materiale

- Svartsurbær fra Plantchem

Reagenser

- Diklormetan (Fluka) og 96 % etanol (FI)

Utstyr

- 2 beger glass (5 liter), aluminiumsfolie, morter og pistill
- Filter papir: Whatman[®] Qualitative 1 (Schleicher & Schuell)
- Kvernemaskin: Brabender ”Duisburg”, filter 0,9 mm
- Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments)

Prosedyre

- Frosne bær ble knust i morter, så ble de overført til to 5 liters begerglass.
- 1,5 liter diklormetan ble tilsatt til hvert begerglass (10 cm over bærene).
- Begerglassene ble så dekket med aluminiumsfolie og satt til henstand i en dag.
- Bærene ble filtrert fra diklormetanelekstrakt.
- Punktene b-d ble gjentatt to ganger.
- 1,5 liter 96 % etanol ble så tilsatt i hvert begerglass med bærene, og satt til henstand i tre dager.
- 96 % etanolekstrakt ble filtrert fra bærene.
- Bærene ble spredd på folien og ble satt til tørk i varmeskapet (40 °C, 1 døgn)
- De tørre bærene ble pulverisert med en mekanisk pulveriseringsmaskin.
- Bærmaterialet var nå klart for videre ekstraksjon med andre ekstraksjonsmidler.

5.2.2 Ekstraksjon av pulversert bærmateriale

Prinsipp

Pulverisert bærmateriale ekstraheres med kokende 96 % etanol for å fjerne relative upolare og lavmolekylære forbindelser som salter, fargestoffer, organiske syrer og lav molekylvekt sukker samt protein. Det er viktig å fjerne disse forbindelsene, siden de kan interferer ved kommende analyser. 50 % etanol er mer polart og vil dermed ekstrahere ut litt mer polare forbindelser enn det som kommer ut i 96 % etanol ekstraksjonen.

Vannløselige polysakkarider ekstraherer med vann, både i 50 °C og 100 °C. Siden løseligheten av polysakkarider i vann er temperatur avhengig, vil vann i ulike temperaturer kunne trekke ut forskjellige polysakkarider.

5.2.2.1 Ekstraksjon med 50 % etanol

Materiale

- Pulverisert bærmateriale

Reagenser

- 96 % etanol (FI)

Utstyr

- Soxhletekstraktor koplet til tilbakeløpskjøler
- Soxhletfilter
- 5 liters rundkolbe og varmemantel

Prosedyre

- a. Pulverisert bærmateriale ble plassert i soxhletfilter.
- b. 3,5 liter 96 % etanol ble tilsatt i rundkolben.
- c. Bærmaterialet ble ekstrahert i to dager.
- d. Etanolekstraktet ble tappet ut av rundkolben og 3,5 liter ny 96 % etanol ble tilsatt.
- e. Bærmaterialet ble ekstrahert videre til etanolen ble nesten fargeløs (fire dager).
- f. Bærmaterialet ble satt til tørk i avtrekk over natten, og var klar for neste ekstraksjonstrinn.
- g. Etanolekstraktet ble oppkonsentrert og konsentrasjonen ble bestemt.

5.2.2.2 Ekstraksjon med 50 % etanol

Materiale

- Residuet fra 96 % etanolekstraksjon

Reagenser

- 50 % etanol (FI)

Utstyr

- 5 liter rundkolbe
- Tilbakekjøler
- Varmemantel: BI Barnstead Electrothermal
- Glassfiberfilter: Whatman[®] Glass-micro fibre 150 mmø GF/F (Schleicher & Schuell)
- Filter papir: Whatman[®] Qualitative 1 (Schleicher & Schuell)
- Nutsj og vannstrålepumpe
- Sentrifuger: Multige 4KR (Heraeus Sepatech)

Prosedyre

- a. Tørt bærmateriale ble plassert i en rundkolbe, og 2,5 liter 50 % etanol ble tilsatt.
- b. Bærmaterialet ble ekstrahert under koking i en time.
- c. Rundkolben ble avkjølt på benken.
- d. Ca. 1,5 liter etanolekstrakt ble sentrifugert i 20 minutter ved 4000 rpm, 8 °C.
- e. Supernatanten ble filtrert fra med vannsug og tatt vare på.
- f. Bærmaterialet ble overført tilbake til rundkolben. Ny 1,5 liter 50 % etanol ble tilsatt og ekstrahert i en time under koking.
- g. Trinn e-f ble gjentatt til ekstraktet ble fargeløst.
- h. Ekstraktene ble slått sammen, dampet inn på rotavapor og konsentratet ble satt i fryseren for å unngå bakterievekst. I tillegg ble konsentrasjonen av ekstraktet bestemt.

5.2.2.3 Ekstraksjon med 50 °C vann

Materiale

- Residuet fra 50 % etanolekstraksjon

Reagenser

- Destillert vann

Utstyr

- Varmeplate med magnetrører
- 5 liter begerglass
- Glasstav
- Termometer
- Nutsj og vannstrålepumpe
- Glassfiberfilter: Whatman® Glass-micro fibre 150 mmø GF/F (Schleicher & Schuell)
- Sentrifuger: Multige 4KR (Heraeus Sepatech)

Prosedyre

- a. Bærmaterialet fra 50 % etanol ekstraksjon ble plassert i en 5 liters beger.
- b. Det ble tilsatt 2,5 liter destillert vann.
- c. Bærematerialet ble ekstrahert under røring i 1 time ved 50 °C. Temperaturen ble kontrollert med termometer
- d. Innholdet ble dekantert og sentrifugert i 20 minutter ved 4000 rpm, 8 °C.
- e. Supernatanten ble filtrert og tatt vare på, mens bærematerialet ble overført tilbake til begeret.
- f. Trinn b-e ble gjentatt to ganger.
- g. Ekstraktet ble slått sammen, dampet inn med rotavapor og konsentratet ble satt i fryseren for å unngå bakterievekst. I tillegg ble konsentrasjonen av ekstraktet bestemt.

5.2.2.4 Ekstraksjon med 100°C vann

Materiale

- Residuet fra 50 °C vannekstraksjon

Reagenser

- Destillert vann

Utstyr

- Rundkolbe 5 liter
- Tilbakekjøler
- Glassfiberfilter: Whatman® Glass-micro fibre 150 mmø GF/F (Schleicher & Schuell)
- Varmemantel: BI Barnstead Electrothermal
- Nutsj og vannstrålepumpe
- Sentrifuger: Multige 4KR (Heraeus Sepatech)

Prosedyre

- a. Residuet fra 50 °C vann ekstraksjon ble plassert i en rundkolbe og 1, 5 liter destillert vann ble tilsatt. Residuet ble ekstrahert i en 1 time under koking.
- b. Innholdet ble dekantert og sentrifugert i 20 minutter ved 4000 rmp, 8 °C.
- c. Supernatanten ble filtrert og tatt vare på, mens residuet ble overført tilbake til rundkolben.
- d. Trinn b-c ble gjentatt to ganger.
- e. Ekstraktet ble slått sammen, dampet inn i rotavapor og konsentratet ble satt i fryseren for å unngå bakterievekst. I tillegg ble konsentrasjonen av ekstraktet bestemt

5.3 Opprensing og separering av polysakkarider

5.3.1 Absorpsjonskromatografi med amberlite XAD-7HP kolonne

Prinsipp (Sirnes, 2003)

Amberlite XAD-7HP er et adsorpsjonsmiddel og består av et svakt polart resin av akrylester. Kolonnen brukes til å rense 50 % etanolekstrakt, siden dette ekstraktet inneholder mye fargestoffer (antocyaniner). Metoden baserer seg på adsorpsjonskromatografi. For å kunne separere ulike forbindelser fra hverandre må de ha ulik affinitet til adsorpsjonsmidlet og interaksjonen er reversibel. Forbindelsene som har lavest affinitet elueres ut av kolonnen før de med høyere affinitet. Destillert vann brukte til å eluere ut polysakkarider. Fargestoffer og hydrofobe forbindelser ble eluert ut med metanol, trifluoreddiksyre i metanol og aceton i vann.

Materiale

- 50E-Rå (47,4 mg/ml)

Reagenser

- Metanol (Chemiteknik)
- Trifluoreddiksyre (Merck)
- Aceton (Chemiteknik)

Utstyr

- Kolonnemateriale: Amberlite XAD-7HP, 100 g (Sigma)
Partikkelstørrelse: 20–60 mesh (wet)
- Kolonnevolum: 100ml
- Sentrifugerer RB: 15 ml (Heger AS)
- Glasspipette: 20 ml
- Oppsamlingsør: Sentrifugerør RB, 15 ml (Heger)

Prosedyre

1) Pakking av kolonne

- a. 100 mg kolonnematerial ble overført til kolonnen.
- b. Ca. 100 ml metanol ble så tilsatt kolonnen (blandet/fuktet materialet ved å vende kolonnen opp og ned, ristet når det var luft mellom kolonnematerialet.)
- c. Kolonnen ble vasket med 500 ml metanol og deretter med 500 ml destillert vann.
- d. Ved henstand hadde kolonnen en vannhøyde på 0,5 cm over kolonnematerialet.

2) Eluering av prøve

- a. 20 ml prøve ble applisert på kolonnen ved hjelp av en glasspipette.
- b. Prøven ble eluert med destillert vann. Det ble dryppet ekstra sakte de fem første fraksjonene, for at prøven skulle få nok tid til å interagere med kolonnematerialet.
- c. Så ble det eluert med maks hastighet. Totalt ble det samlet 36 rør med vanneluat. Det var 10 ml 10 ml per. rør.
- d. Eluering med destillert vann foregikk inntil vanneluatet ble fargeløst.
- e. Deretter ble det eluert med metanol til fargeløst eluat.
- f. Så ble det eluert med 0,1 % trifluoreddiksyre i metanol til fargeløst eluat (minst 200 ml).
- g. Deretter ble det eluert med aceton:vann (70:30) det ble fargeløst (minst 200 ml).
- h. Tilslutt ble det vasket med 200 ml metanol og 300 ml destillert vann.
- i. De 36 rørene med vanneluat ble testet for karbohydratinnhold med fenol-svovelsyretest.
- j. Trinn a-i ble gjort 12 ganger.
- k. Ut fra karbohydratprofilen ble forskjellige rør fra disse 12 kjøringene slått sammen, oppkonsentrerte på rotavapor, så ble konsentratet satt i fryseren for å unngå bakterievekst. I tillegg ble konsentrasjonen av eluatet bestemt.

5.3.2 Gelfiltrering med Bio-Gel P-6 DG kolonne

Prinsipp (Greibrokk et al., 2005; Bio-Rad Laboratories, 2000)

Gelfiltrering eller eksklusjonskromatografi separerer stoffer etter deres molekylstørrelse. Betegnelsen gelfiltrering er kjent som et gammelt og innarbeidet begrep, da separasjonen skjer i et vandig miljø. Gelmateriale eller stasjonærfase er et porøst pakkematerial med en definert porestørrelse som bestemmer fraksjoneringsområde. Bare stoffer med molekylstørrelser innenfor dette området blir separert. Når de forskjellige stoffer elueres ut av kolonnen vil det være avhengig av deres størrelse og diffusjonsevne. De største elueres ut først og de minste til slutt.

Elueringen skjer når mobilfasen fyller porene og bringer stoffer gjennom kolonnen. Stoffer som ligger utenfor fraksjoneringsområdet blir ikke separert. De med molekylstørrelse større enn fraksjoneringsområdet blir ekskludert fra porene, mens de mindre trenger gjennom porene og kommer ut med mobilfasen uten å bli separert.

En forutsetning for separasjon etter molekylstørrelse er at pakkematerialet skal være inert, porøs og stabil samt ikke gi interaksjon med stoffer. Bio-Gel P-6 DG oppnår disse kravene. Pakkematerialet er en hydrofil og ladningsfri polyakrylamid gel. Gelen framstilles ved friradikal copolymering av akrylamid og N, N-metylenbisakrylamid, og har fraksjoneringsområdet 1000–6000 Daltons. Dette fraksjonsområdet er velegnet til å separere de store polysakkaridene fra salter og andre mindre molekyler i ekstraktene

Materiale

- 50E-Amb (6,2 mg/ml)
- 50V-Rå (5,8 mg/ml)
- 100V-Rå (15,4 mg/ml)

Reagenser

Standarder: 25 mg dekstran ($M_w = 50,000$) & 50 mg raffinose ($M_w = 594,5$)

Elueringsmiddel: Degasset destillert vann

Betingelser:

- Mobilfasehastighet: 1 ml/min
- Fraksjonstørrelse: 10 ml per. rør

Utstyr:

- Kolonne: XK-50/30 (GE-Healthcare) d:5cm, h:24 cm, v:470 ml
- Kolonnemateriale: Bio-Gel P-6 Desalting Gel, partikkelstørrelse 90–180 (Bio-rad)
Fraksjoneringsområde: 1000–6000 Daltons
- Pumpe: Peristaltic Pump P-1 (Pharmacia)
- Fraksjonssamler: Frac-920 (Amersham Biosciences)
- Mikrofilter: Acro[®] 50A Filter Device with 5µm Versapor[®] membrane,
Non-sterile (Life Sciences)
- Sprøyte: BD plastic, 50 ml
- Oppsamlingsrør: Sentrifugerør RB, 15 ml (Heger)

Prosedyre

1) Pakking av kolonne

- a. 80 g tørt kolonnemateriale ble tilsatt i en kolbe, så ble det tilsatt 1 liter destillert vann.
- b. Det ble satt til henstand for svelling i 21 timer i romtemperatur.
- c. Halvparten av supernatanten ble dekantert av.
- d. 1 liter destillert vann ble tilsatt og blandingen ble ristet. Etter at ca. 90–95 % av kolonnematerialet hadde sedimentert, ble supernatanten dekantert av. Dette ble gjentatt 3 ganger for å fjerne over 90 % av de minste og letteste partiklene.
- e. Gelblandingen ble degasset under forsiktig omrøring i 15 minutter og så ble den overført til kolonnen ved å helle langs en glasstav for hindre luftbobler i kolonnematerialet.
- f. Kolonnematerialet ble pakket og eluert med destillert vann med hastighet 1 ml/min i 24 timer

2) Applisering av standarder

- a. 25 mg dekstran og 50 mg raffinose ble løst i 100 ml destillert vann.
- b. Løsningen ble filtrert over i en elenmeyerkolbe med vakuumåpning, og degasset ved hjelp av vannstrålepumpe under forsiktig omrøring i 10 minutter.
- c. Standardløsningen ble applisert på kolonnen og eluert med destillert vann.
- d. Eluatet ble samlet i fraksjoner på 10 ml pr. rør og karbohydratprofil ble lagd ved hjelp av fenol-svovelsyretest.
- e. Kolonnen ble vasket med minst 2 kolonnevolum (24 timer) før en ny prøve ble applisert.

3) Applisering av prøver

- a. 100 ml filtrert prøveløsning ble applisert på kolonnen og eluert med destillert vann.
- b. Det ble totalt samlet opp i 80 fraksjoner (rør), 10 ml pr. rør.
- c. Fraksjonene ble testet med fenol-svovelsyretest og karbohydratprofil ble lagd. Basert på standardenes karbohydratprofil ble prøven delt i tre store fraksjoner (lav-, intermediær- og høymolekylær fraksjon).
- d. Den høymolekylære fraksjonen ble oppkonsentrert og satt i fryseren for videre fraksjonering. Konsentrasjonen av eluatet ble også bestemt.

5.3.3 Separering med PD-10 Desalting kolonne

Prinsipp: (GE-Helthcare, 2009)

Kolonnen er ferdigpakket med Sephadex G-25 medium. Bruksområde for kolonnen er blant annet desalting og prøveopprensing. Den har et fraksjoneringsområde på 1000–5000 Daltons, noe som gjør det mulig å isolere høy fra lav molekylære substanser.

Utstyr

- Kolonne: PD-10 (GE-Helthcare) diameter:1,5 cm, høyde:5 cm og volum:8,3 ml
- Pakkemateriale: Sephadex G-25
- Partikkelstørrelse:85-260 μ m,
- Sprøyte: BD plastic, 10 ml

Prosedyre

- a. Kolonnen ble først stilt i loddrett, så ble den vasket med 25 ml destillert vann.
- b. Et totalt prøvevolum på 2,5 ml ble applisert på kolonnen
- c. 3 ml destillert vann ble brukt til å eluere ut høy molekylære substanser/polysakkarider. Dette eluatet ble tatt vare på.
- d. Kolonnen ble vasket med 25 ml destillert vann før en ny prøve ble applisert.

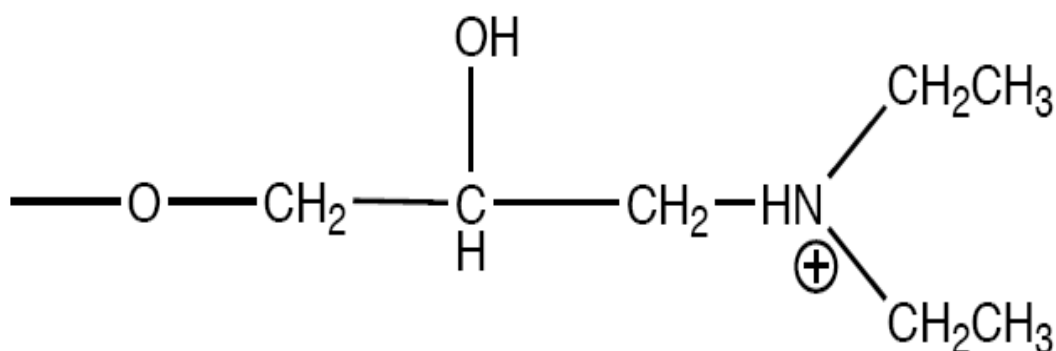
5.3.4 Ionebytterkromatografi med ANX Sepharose 4 Fast Flow kolonne

Prinsipp (Greibrokk et al., 2005; GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2006)

Ionebytterkromatografi er en separasjonsmetode for ioniserbare stoffer. Matriksen til en ionebytter består som regel av et uløselig polymert materiale eller av silika, med kovalent bundne ioniserte grupper. Disse gruppene er assosiert med et motion med motsatt ladning. Dette ionet kan reversibelt skiftes ut med andre ioner, f. eks. stoffer fra en prøve, derav navnet ionebytter. Separasjonen er basert på at ulike stoffer har forskjellig elektrostatiske tiltrekning til ionebytteren på grunn av ladningsforskjeller. Stoffer med større affinitet til ionebytteren krever elueringsmiddel med høyere ionestyrke for å elueres ut enn stoffer med mindre affinitet.

Ionebytter kan i hovedsak grupperes som anionbytter og kationbytter. Anionbytteren har et kovalent bundet kation og et utbyttbart anion, motsatt blir det for kationbytter. Disse kan videre være sterke eller svake ionebyttere. Sterke ionebyttere er ladet i hele pH-området, mens svake ionebyttere kun er ladet i deler av pH-området.

ANX Sepharose 4 Fast Flow er et svakt anionbytte med dietylaminopropyl som kation (figur 5.2). Negative ladde polysakkarider binder seg med ulik affinitet til kationen og kan dermed elueres/separeres med en gradientløsning av natriumklorid. Nøytrale og positive ladde polysakkarider blir ikke separert. De strømmer gjennom kolonnen uten forsinkelse.



Figur 5.2: Strukturen til ANX Sepharose – et svakt anionbytte, der den funksjonelle gruppen dietylaminopropyl er vist. (Opsahlseter, 2008).

Materialie

- 50E-Gel (2,7 mg/ml)
- 50V-Gel (0,9 mg/ml)
- 100V-Gel (5,2 mg/ml)

Reagenser

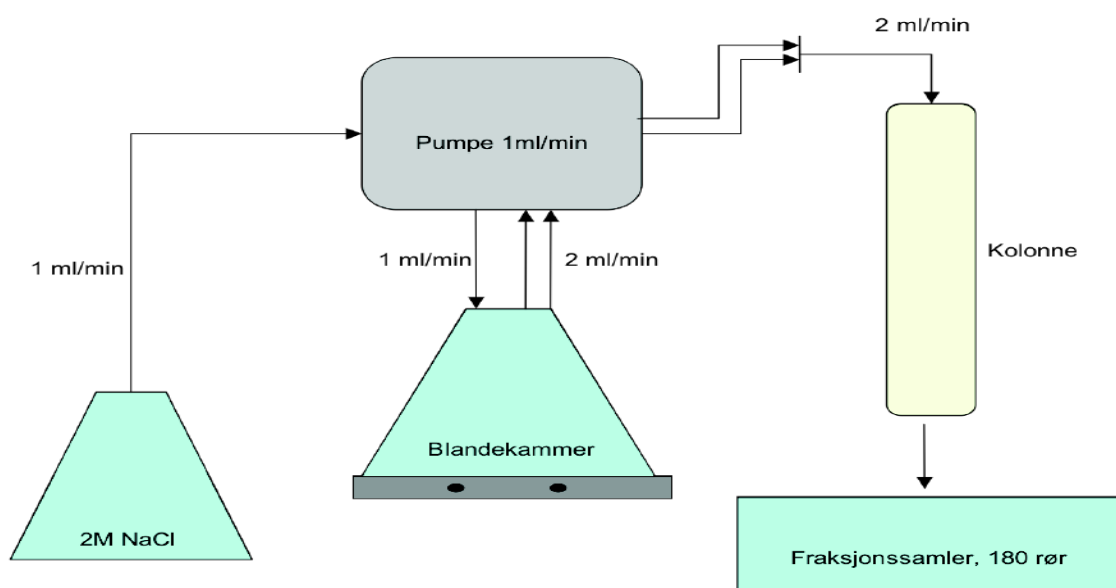
Elueringsmiddel: Degasset destillert vann
 2 M natriumkloridløsning

Betingelser:

- Mobilfasehastighet: 2 ml/min
- Fraksjonstørrelse: 10 ml per. rør

Utstyr

- Kolonne: XK-50/30 (GE-Healthcare) d:5cm, h:17 cm, v:330 ml
- Kolonnemateriale: Anx-sepharoseTM 4 fast flow (GE Heathcare Bio-sciencens AB)
- Pumpe: Peristaltic Pump P-1 (Pharmacia)
- Fraksjonssamler: Frac-920 (Ambersham Biosciences)
- Mikrofilter: Acro[®] 50A Filter Device with 5µm Versapor[®] membrane, Non-sterile (Life Sciences)
- Sprøyte: BD plastic, 50 ml
- Oppsamlingsrør: Sentrifugerør RB, 15 ml (Heger)



Figur 5.3: Skjematisk presentasjon av ionebytterkromatografi-oppsett. Den består av en kolbe med 2 M natriumkloridløsning, blandekammer, pumpe, kolonne og fraksjonssamler (Opsahlseter 2008)

Prosedyre

1) Pakking av kolonne

- a. Pakkematerialeløsning ble overført til en kolbe med vakuumåpning.
- b. Løsningen ble degasset under vannsug i 15 minutter, så overført forsiktig til kolonnen.
- c. Kolonnematerialet ble pakket ved å eluere med to kolonnevolum degasset, destillert vann. Flowhastigheten var 2 ml/min.

2) Applisering og eluering av prøve

- a. 200 ml filtrert og degasset prøve ble applisert på kolonnen med en flowhastighet på 2 ml/ml.
- b. Nøytrale forbindelser/polysakkarider ble eluert ut med 1 kolonnevolum destillert vann. Eluatet ble samlet, fordampet og frysetørket.
- c. Sure polysakkarider ble så eluert ut med en gradient 0-2 M NaCl-løsning. Eluatet ble samlet i 180 rør. Det var 10 ml pr. rør. De ble testet med fenol-svovelsyretest og karbohydratprofil ble lagd. På grunnlaget ble denne profilen rørene slått sammen, dialysert (5.1.11) og frysetørket (5.1.9)
- d. Kolonnen ble regenerert med 0,5 kolonnevolum 2 M NaCl-løsning.
- e. Kolonnen ble så vasket med minst 2 kolonnevolum destillert vann og inntil 1 ml av eluatet ikke lenger ble blakket av en dråpe 10 % sølvnitratløsning, før ny prøve ble applisert på kolonnen.

5.4 Biologisk aktivitet

5.4.1 Komplementfikseringstest

Prinsipp (Michaelsen et al., 2000; Yamada & Kiyohara, 2007)

Prøvene ble først inkubert med humant komplement, for å gi dem tid til å modulere komplementet. Sensibiliserte røde blodceller fra sau ble så tilsatt, disse cellene var på forhånd sensibilisert med kanin antistoff. Komplementet binder seg da til sensibiliserte blodcellene, og komplementkaskaden blir aktivert, noen som fører til perforering av blodcellemembraner og cellene hemolyseres. Prøvens evne til å påvirke komplementet ble målt i prosent hemming av hemolyse. PMII, en pektinfraksjon fra *Plantago major* ble brukt som standard. Prøvenes effekt sammenlignes med PMII. Som kontrollprøve ble det benyttet Veronal/BSA-buffer. Hvis hemolysen til kontrollprøve og prøve er lik betyr det at prøven verken aktiverer eller hemmer komplementet.

Fordi både aktivering og hemming av komplementsystemet resulterer i en nedgang i grad av hemolyse, sier testen ikke noen om prøven hemmer eller aktiverer komplementsystemet. En nedgang i hemolyse indikerer bare at prøven har komplementfikserende aktivitet, det vil si at den påvirker komplementsystemet.

Materiale

- Alle fraksjoner med unntatt av 50E-S1 (figur 2.1)

Reagenser

- Veronal/BSA-buffer: CFT pH 7,2 med 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)
30 % og 0,02 % Natriumazid
03.mars -2008 Tersi Folkehelseinstitutt subratlaboratorie
- Blodceller fra sau: Hvit 147, tappet 30/10-2008
- Standard: *Plantago major* L, fraksjon II (PMII), 1 mg/ml 14/05-2008
- Antistoff: Virion 9020 Amboceptor serum hemolysia
Fortynnet 1:10 i veronal/BSA-buffer 0,5/09-2008
- Fosfatbuffer

Utstyr

- Mikrotiterplate, 96 runde brønner og 96 flate brønner
- Varmeskap (37 °C) med ristepate
- Mikroplateleser og miksemaskin
- Multipipette og finnpipette

Prosedyre:

- 1) Vasking av saueblodceller før sensibilisering (100 µl saueblodceller pr. full plate)
 - a. Det ble tatt ut en mengde blod (500 µl)
 - b. Blodet ble vasket 2 x 3 ml fosfatbuffer og en gang med 3 ml Veronal/BSA buffer.
Det ble sentrifugert 3000 rpm mellom hver vask og vaskevannet ble fjernet.
- 2) Sensibilisering av saueblodceller (til en full plate)
 - a. I et glassrør med 60 µl pakkeblodceller ble det tilsatt 15 µl Virion 9020 Amboceptor og 5,925 ml veronal/BSA buffer. Blandingen ble deretter inkubert under risting ved 37 °C i 30 minutter.
 - b. Blandingen ble vasket 2 x 3 ml fosfatbuffer og en gang med 3 ml Veronal/BSA buffer. Det ble sentrifugert mellom hver vask og vaskevannet ble fjernet.
 - c. Blodet ble så fortynnet med 5,940 ml Veronal/BSA buffer (tilsvarer 1 % blanding av blodceller)
- 3) Titreringskurve for komplementkilden
Det ble laget åtte løsninger med forhold 1: 40 – 1: 110 bestående av komplement og veronal/BSA-buffer.

Forhold	Komplement (µl)	Veronal/BSA-buffer (µl)
1:40	10	390
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890
1:100	10	990
1:110	10	1090

Tabell 5.1: Løsninger med innhold av forskjellige forhold med komplement og buffer.

- a. I en plate (rund bunn) ble det tilsatt 100 µl destillert vann i fire brønner og 50 µl veronal/BSA-buffer i 32 brønner.
- b. Fire paralleller av hver komplementløsning (4 x 50 µl) ble tilsatt til brønnene med buffer.
- c. Det ble så tilsatt 50 µl 1 % SRBC til alle brønner.
- d. Planten ble dekket med en blank tape og satt til inkubering under risting i 30 minutter ved 37 °C, så sentrifugert i 5 minutter ved 1450 rpm.
- e. 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet plate og sentrifugert i 5 minutter ved 1450 rpm.
- f. Absorbansen ble målt og lyseringsgrad ble regnet ut ved hjelp av formelen:

$$\text{Lyseringsgrad} = (\text{Abs}_{\text{kontroll}} / \text{Abs}_{\text{destillert vann}}) \times 100 \%$$

4) Fortynning av prøvene:

En prøvemengde (1-1,2 mg) ble løst med veronal/BSA-buffer, slik at konsentrasjon ble 1mg/ml. Deretter ble det laget en fortynningsrekke som er vist på tabell 5.2.

Nummer til rør	Innhold	Konsentrasjon
1.rør	Stoff + veronal/BSA-buffer	1 mg/mg
2. rør	400 µl veronal/BSA-buffer + 400 µl fra 1.rør	500 µg/ml
3.rør	600 µl veronal/BSA-buffer + 200 µl fra 2.rør	125 µg/ml
4.rør	600 µl veronal/BSA-buffer + 200 µl fra 3.rør	31,3 µg/ml
5.rør	600 µl veronal/BSA-buffer + 200 µl fra 4.rør	8 µg/ml
6.rør	600 µl veronal/BSA-buffer + 200 µl fra 5.rør	2 µg/ml

Tabell 5.2: En mal for å lage fortynningsrekke til de forskjellige prøver.

5) Utføring av testen:

- a. Til en mikroplate (rund bunn) ble det tilsatt (tabell 5.3):
 - To paralleller (2x50 µl) av PMII-standard og prøver
 - 50µl veronal/BSA-buffer til fire brønner
 - 100 µl destillert vann til fire brønner (100 % lysekontroll)
- b. Alle brønner unntatt de med vann ble tilsatt 50 µl nylig laget komplement.
- c. Platen ble dekket med en blank tape og satt på resting ved 37 °C i 30 minutter.
- d. 50 µl 1 % sensibiliserte blodceller ble tilsatt hver brønn. Platen ble deretter dekket med blank tap, så inkubert med resting ved 37 °C i 30 minutter.
- e. Platen ble sentrifugert i 5 minutter ved 1450 rpm
- f. 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet plate, og det ble tilsatt 100 µl veronal/BSA-buffer til de fire ledige brønner. Platen ble deretter sentrifugert i 5 minutter ved 1450 rpm.
- g. Absorbansen ble målt.

Prøve	Konsentrasjon (µg/ml)											
	1000		500		125		31,3		8		2	
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
PMII	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kontr.	B	B	B	B	V	V	V	V	--	--	--	--

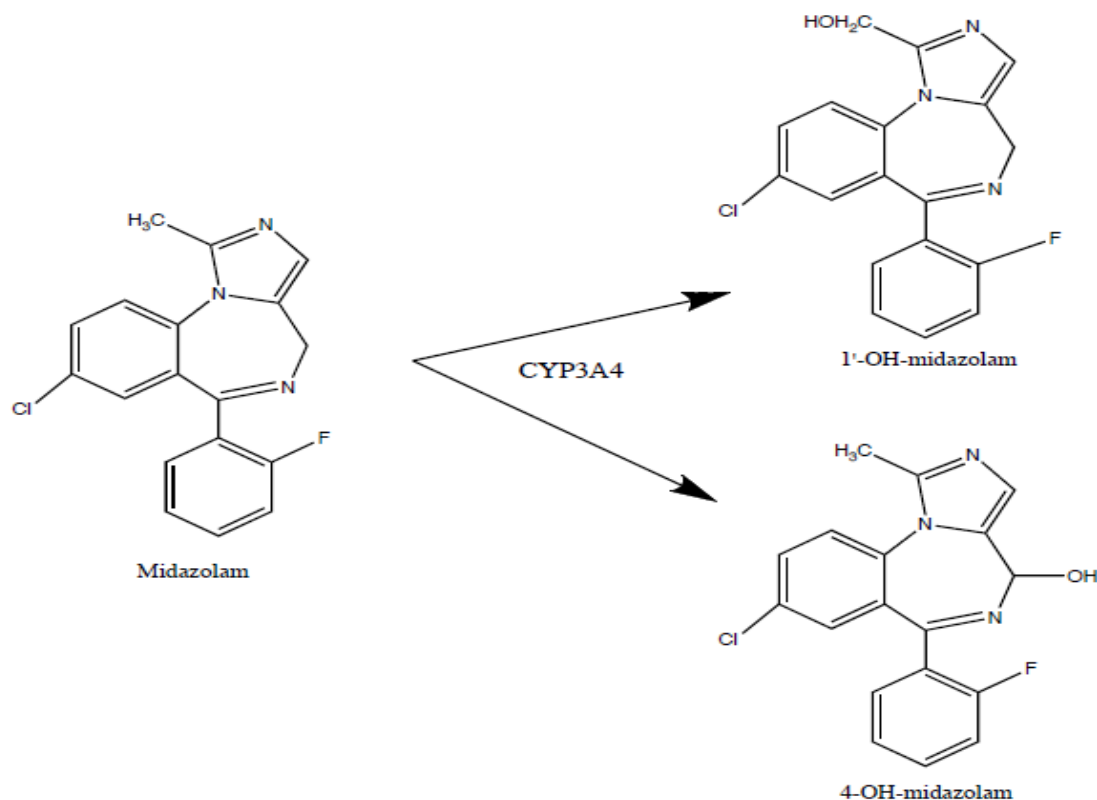
Tabell 5.3: Appliserings mal for standard (S), prøve(P), buffer (B) og vann (V).

5.4.2 Påvirkning på CYP3A4 +b5 – Metabolisme av midazolam

Prinsipp (Postvoll, 2006)

Midazolam er et korttidsvirkende søvninduserende legemiddel, tilhører imidazobenzodiazepingruppe. Stoffet metaboliseres via CYP3A-enzymet til metabolitter, 1-hydroksey-midazolam og 4-hydroksey-midazolam. Metabolismen skjer for det meste via CYP3A-enzymet. Dette er grunnen til at midazolam er fortrukket som en CYP3A-modellsustring både for in vivo og in vitro tester. Hensikten med testen er å se ulike råekstrakter og fraksjoner fra svarturbær kan endre metabolisme av midazolam. Eventuelle endringer i metabolismen kan måle ved å utsette midazolam for CYP3A-enzymet med og uten prøve tilstede. Diazepam ble brukt som intern standard.

Testen ble utført med LC-MS som er en metode bestående av væskrokromatografi og massespektrometri. Separasjonsprinsipp og deteksjonsprinsipp av stoffer ligner på GC-MS-metode. Forskjellen ligger i mobilfase, i LC-MS er mobilfase en væske, men i GC-MS er mobilfasen en gass.



Figur5.4: Midazolam metaboliseres av CYP 3A4 enzymet til to hoved metabolitter.

Materiale

- Løst i tris-bufferløsning: 50E-Rå, 50V-Rå, 100V-Rå, 50E-Gel, 50V-Gel, 100V-Gel og 50E-Amb.
- Løst i metanol: 96E-Rå og 50E-Met.

Reagenser

- Bufferløsning: Tris-H₂SO₄ (200 mM) (Sigma –Aldrich)
MgSO₄ (20 mM) (Merck)
NADPH (10 mM) (Sigma-Aldrich)
- Supersomer: CYP3A4 + b5 (BD Gentest), fortynning 1:64 (25µl + 1,575 ml Lise Madsen buffer)
- Metanol (Chemiteknik) og etylacetat (Merck)
- Midazolam
- Intern standard: 44 µM Diazepam (Diakonhjemmet) acetonitril (Merck)
- Mobilfase A: 0,05 M ammoniumformiat-buffer pH 4,4
4,036 ml 25 % NH₃
2,125 ml konsentrert HCOOH
1 liter ionebyttet vann

Utstyr

- Whirlmikser (Fisons)
- Vannbad med risteoppsett: KQ 606 (Citenco LTD)
- Nitrogen inndamping oppsett

Betingelser

- Massespektrometer: LC-MS-2010 A (Schimadzu)
- Væskeskromatograf: Schimadzu
- Kolonne: Varian Inerstil C8
L: 50 mm, I.d: 3 mm, partikkelstørrelse 5 µm
- Injeksjonsvolum: 10 µl
- Flowhastighet: 0,5 ml/ml
- Eluering: Gradienteluering 17 minutter
Mobilfase A (som over)
Mobilfase B (95 % acetonitril og 5 % metanol)

Prosedyre

1. Klargjøring av prøver
 - 100 µl (1mg/ml) ikke-vandige prøver løst i metanol, ble overført til glassreagensrør. Prøvene ble dampet til tørrhet og deretter reløst i 149 µl bufferløsning.
 - 100 µl (1mg/ml) vandige prøver løst i tris-buffferløsning ble overført til glassreagensrør, så ble de tilsatt 13 µl Tris-H₂SO₄ , 5µl MgSO₄ og 30 µl NADPH.
2. Utføring
 - a. Prøven i reagensrøret ble tilsatt 22 µl 20uM midazolamløsning og mikset godt før den ble preinkubert i 5 minutter (37 °C) på vannbad.
 - b. 50 µl mikrosomer ble tilsatt i reagensrøret og inkubert på vannbadet (37 °C) under risting i 7½ minutter.
 - c. 220 µl iskald etylacetat ble tilsatt reagensrøret for å stoppe reaksjonen.
 - d. Reagensrøret ble vippt forsiktig for å danne to faser. Den øverste fasen (etylacetatfase) ble tatt vare på.
 - e. Punktet c-d ble gjentatt.
 - f. Etylacetatfasen ble så dampet til tørrhet under nitrogengass og reløst i 74 µl mobilfase A.
 - g. 50 µl intern standard (acetonitril med diazepam) ble tilsatt og blandet godt.
 - h. Prøvene ble oppbevart i fryser frem til analyse på LC-MS.

5.4.3 Antimikrobiell aktivitet**Prinsipp** (Madigan et al., 2003)

Noen kolonier av mikroorganismer får vokse i en agarskål med egnet vekstmedium. På denne agarskålen blir det plassert runde filterpapir med kjent konsentrasjon av testsubstans på vekstmedium og inkubert i 24–48 timer. Testsubstansen diffunderer fra filterpapiret og ut i vekstmediet og kan føre til hemmet vekst av mikroorganismer. Hemningssonen som oppstår på vekstmediet er målet for antimikrobiell aktivitet. Aktiviteten er avhengig av testsubstansens konsentrasjon, løselighet og diffusjonskoeffisient samt effekt. Jo større hemningssone er, jo større antimikrobiell aktivitet har testsubstansen.

Material

- 96E-Rå, 50E-Met løst i metanol (20 mg/ml)
- 50E-Rå, 50V-Rå, 100V-Rå løst i vann (20 mg/ml)
- 50E-Gel, 50V-Gel, 100V-Gel, 50E-Amb løst i vann (20 mg/ml)

Reagenser:

- Agarskål: Müller Hinton medium (for bakterier)
Sabouraud medium (for sopp)
- 9 mg/ml fysiologisk saltvann
- 0,2 mg/ml gentamicin (aq)
- 0,5mg/ml amphotericin (metanol)
- Metanol (Chemiteknik)
- MC Farland standard 2

Mikroorganismer	Type	Positiv kontroll	Negativ kontroll
Escherichia coli (Remel)	Aerob-bakterie, G-	Gentamicin	Metanol
Pseudomonas aeruginosa (Remel)	Aerob-bakterie, G-	Gentamicin	Metanol
Staphylococcus aureus (Remel)	Aerob-bakterie, G+	Gentamicin	Metanol
Candida albicans (Remel)	Aerob-sopp	Amphotericin	Metanol

Tabell 5.4: Testmikroorganismer, positiv og negativ teststoff som ble brukt under metoden.

Utstyr

- Varmesterilisert glassutstyr
- Metyleringsrør (40 ml)
- Høstepinner
- Begerglass
- Målsylinder
- Pasteturpipette
- Utstansingsrør, d:6 mm
- Filter papir BBLTM Blank Paper Discs, d. 6 mm
- Millex GP Filter Unit 0,22µm
- BD plastic engangssprøyte (60ml)

Prosedyre

Aseptisk arbeidsteknikk ble brukt og det ble utført 3 paralleller.

1) Utsåing av mikroorganismer

- a. Agarskålene ble satt i varmeskap i 1 time ved 37 °C.
- b. Oxoid culti-loop ble fuktet på en oppvarm agarskål i 15 sekunder før mikroorganismene ble strøket ut på skålen.
- c. Skålen ble inkubert med lokket ned i varmeskapet i 24 timer for bakterier og 48 timer for sopp.

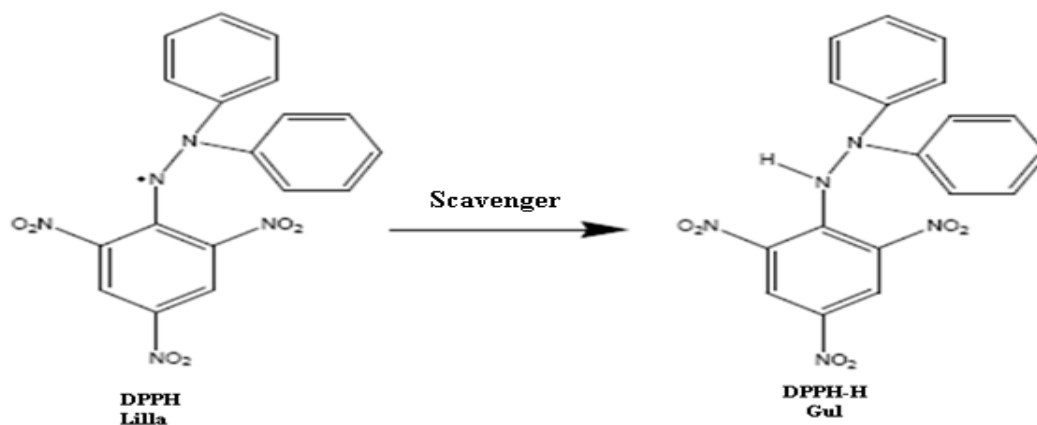
2) Applisering og testing av prøve

- a. 9 g NaCl i 1L kolbe ble fylt med destillert vann til merket. Løsningen ble så sterilfiltrert (0,22µm).
- b. Noen kolonier med bakterier eller sopp ble skrapet av skålen med en høstepinne. Bakteriene eller soppen ble så suspendert i 2 ml sterilfiltrert fysiologisk saltvann, slik at tettheten tilsvarte Mc Farland standard 2.
- c. Det ble så overført 120 µl av suspensjonen til 25 ml sterilfiltrert fysiologisk saltvann, og blandet godt.
- d. 2 ml av dette inokulatet ble overført til en ny agarskål. Skålen ble vippt slik at hele skåloverflaten ble fuktet.
- e. Overskuddet av inokulatet ble fjernet med en pasteturpipette.
- f. Skålen ble satt til henstand i 15 minutter med lokket delvis på, til overflaten var tørr.
- g. Det ble trykket ut brønner med et utstansingsrør til prøvene som var løst i vann og til positiv kontroll-løsning. 50 µl av positiv kontroll-løsning og prøve ble tilsatt i hver sin brønn.
- h. 2 x 25 ml av prøvene som var løst i metanol ble applisert på filterpapir (d:6mm), tørket og plassert på agarskålene.
- i. Et filterpapir ble fuktet med 2x25µl metanol (negativ kontroll). Tørket filterpapiret ble plassert på agarskålen.
- j. Skålene ble satt til henstand i 1 time i romtemperatur (bakterier) eller kjøleskap (sopp).
- k. De ble deretter inkubert i varmeskapet ved 37°C 24 timer for bakterier og 48 timer for sopp.
- l. Hemmingssonene ble avlest med linjal.

5.4.4 Måling av DPPH radikal scavenger aktivitet

Prinsipp (Blois, 1958)

1.1-Diphenyl -2-picryl-hydrazyl (DPPH) er et stabilt fritt radikal som har sterk absorbans ved 517 nm. En løsning av dette radikalet har en mørk lilla farge. DPPH har uparrede elektroner som kan reagere med donorer av elektroner eller hydrogen-radikaler (scavenger). Ved reaksjonen med en scavenger vil det uparrede elektronet i DPPH blir paret. Det omdannes altså DPPH til DPPH-H. Omdanningen til DPPH-H resulterer i nedgang i absorbansen, siden DPPH-H har svakere absorbans ved 517 nm enn DPPH. Det skjer en avfarging, løsningen går fra lilla til gulfarge.



Figur 5.5: Radikal DPPH reagerer med en scavenger og omdannes til DPPH-H som har en gulaktig farge.

Dette prinsippet kan utnyttes til å måle scavenger aktivitet til en substans. Absorbans til DPPH blir målt før og etter testsubstans-tilsetning. Hvis substansen har radikal scavenger aktivitet vil den gi en nedgang i absorbans.

Hvor mange prosent radikalscavenging testsubstansen gir, kan bestemmes med formelen:

$$100 \times (A_o - A_t) / (A_o - A_p)$$

A_o = Startabsorbans (korrigert for egenabsorbans av testabsorbans og fortynning),

A_t = Sluttabsorbans etter reaksjon med testsubstansen

A_p = Egenabsorbans av sluttproduktet DPPH-H (i vårt forsøk ble A_p satt til 0, fordi den utgjorde bare 2 % A_o)

Material

- 96E-Rå, 50E-Rå, 50E-Met, 50E-Gel, 50E-Amb

Reagenser

- DPPH (1.1-Diphenyl -2-picryl-hydrazyl) (Sigma)
- DMSO (dimetylsulfoxid) (Merk)
- Metanol (Chemi-teknik)

Utstyr

- Beger, finnpipette (200 µl -5 ml), supelcorør med skrukork. og plate medagnetrører
- Spektrofotometer: Biochrom Libra S32PC

Prosedyre

1. Fortynning av prøve:
 - a. 20 mg prøve ble veid inn i supelcorøret.
 - b. 2 ml DMSO-løsning ble tilsatt og mikset godt. Det ble så laget en tofolds fortynningsrekke (tabell 5.5) (fra 10 mg/ml -0,31 mg/ml).

1.rør (10 mg/ml)	2.rør (5 mg/ml)	3.rør (2,5 mg/ml)	4.rør (1,25 mg/ml)	5.rør (0,63 mg/ml)	6.rør (0,31 mg/ml)
20 mg prøve	1 ml fra rør nr.1	1 ml fra rør nr.2	1 ml fra rør nr.3	1 ml fra rør nr.4	1 ml fra rør nr.5
2 ml DMSO	1 ml DMSO	1 ml DMSO	1 ml DMSO	1 ml DMSO	1 ml DMSO

Tabell 5.5: Oppsett for tofold fortynningsrekke av prøver.

2. Laging av DPPH-løsning
 - a. DPPH ble løst i metanol. Løsningen ble blandet godt på en magnetrører.
 - b. Spektrofotometeret ble nullstilt med metanol.
 - c. DPPH-løsningens absorbans ble målt ved 517 nm. Konsentrasjonen av DPPH-løsningen ble justert slik at absorbansen ble $1,0 \pm 0,1$.
3. Utføring av test
 - a. Startabsorbans ble målt i 2,95 ml DPPH-løsning ved 517 nm.
 - b. 50 µl prøveløsning ble umiddelbart tilsatt DPPH-løsningen. Løsningen ble så blandet med en plastspatel.
 - c. Registrering av absorbansen startet 30 sekunder etter at prøven var tilsatt.
 - d. Absorbansen ble målt over en 5 minutters periode.
 - e. Tre paralleller av hver prøve ble analysert.

5.5 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold

5.5.1 Testing for karbohydratinnhold med fenol-svovelsyretest

Prinsipp (Brummer & Cui, 2005)

Fenol-svovelsyretest kan brukes til å bestemme karbohydratinnhold i en løsning. I nærvær av konsentrert svovelsyre og varme vil karbohydrater omdannes til furan-derivater. Disse derivatene kondenserer med fenol til et mørkfarget kompleks.

Komplekset absorberer UV-lys ved 490 nm og absorbans er proporsjonal med karbohydratinnhold i løsningen. Testen brukes for å bestemme hvilke fraksjoner som inneholder karbohydrat etter en separasjon på Amberlite XAD-7HP-kolonne (adsorpsjonskromatografi), Bio-Gel P-6 DG-kolonne (gelfiltrering) eller ANX Sepharose 4 Fast flow-kolonne (ionebytterkromatografi). Basert på karbohydratprofilen blir det bestemt hvilke fraksjoner som skal slås sammen.

Reagenser

- 4 % fenolløsning (Merck)
- Konsentrert svovelsyre (Merck)

Utstyr

- Finnpipette (40–200 µl)
- Pipette (Gilson microman)
- Glassrør (5 ml)
- Whirlimixer (Fisons)
- Microtest plate 96, flatbunnet (Sarstedt)

Prosedyre

- 100 µl av de isolerte fraksjonene ble overført til hvert sitt glassrør, deretter ble det tilsatt 200 µl 4 % fenolløsning og 1 ml konsentrert svovelsyre.
- Løsningen ble mikset godt og satt i henstand i 30 minutter i romtemperatur.
- Løsningen ble mikset godt igjen.
- 100 µl løsning ble overført til mikrotiterplate og absorbans ved 490 nm ble målt

5.5.2 Monosakkaridbestemmelse

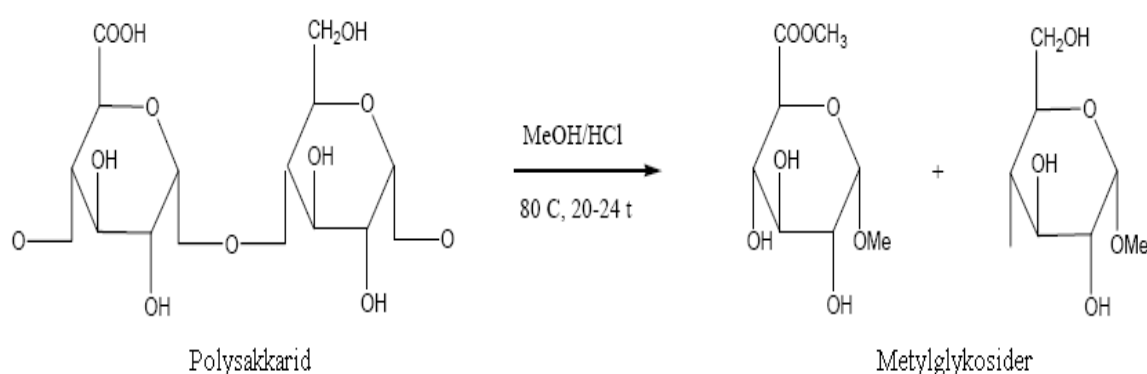
5.5.2.1 Metanolyse

Prinsipp (Chambers & Clamp, 1971)

Monosakkaridsammensetningen i et polysakkarid kan bestemmes med metanolyse.

I metanolysetrinnet spaltes glykosidbindinger mellom monomere i et polysakkarid og danner metylglykosider. Spaltingen skjer med sterk syre i vannfri metanol.

Metylglykosidene som dannes er svært stabile i dette sure miljøet. Metylglykosidene må TMS-derivatisere før de kan identifisere på GC-FID.



Figur 5.6: Glykosidbindinger i et polysakkarid spaltes ved metanolyse. I dette tilfelle dannes det metylglykosider med og uten metylestergruppe (Hansen, 2000.)

Materiale:

- Alle fraksjoner (figur 2.1)

Reagenser

- Intern standard: 1 mg/ml mannitol i metanol (FI)
- 4 M HCl i metanol (FI) og vannfri metanol (FI)

Utstyr

- Syrevaskede supelcorør med teflonbelagt skrukork, 4 ml
- Syrevaskede glasspipette
- P₂O₅-eksikator
- Nitrogengass inndamping oppsatt: Reacti-ThermTMIII Transferpettor
- Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments)
- Brand Transferpettor pipette og syrevaskede SMI rør

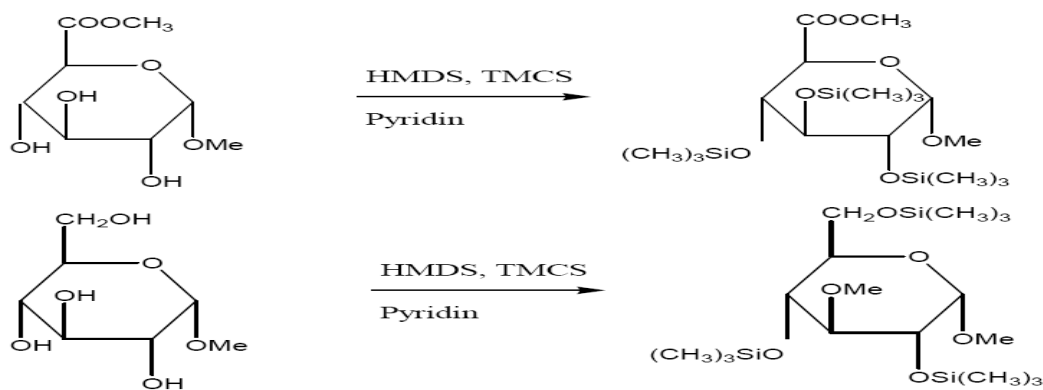
Prosedyre

- 1 mg frysetørket prøve ble veid inn i supelcorør.
- Røret ble dekket med perforert parafilm og tørket i en P_2O_5 -vakuumeksikator i minst 24 timer.
- Prøven ble tilsatt 1 ml 4 HCl i metanol og 100 μ l intern standard.
- Prøven ble satt i varmeskap i 20 timer ved 80 °C. Etter 15 minutter ble korken etterskrudd godt for å hindre fordamping.
- Prøven ble dampet inn til tørrhet med nitrogengass ved 37 °C.
- 200 μ l vannfri metanol ble tilsatt prøven og dampet til tørrhet med nitrogen.
- Punktet f ble gjentatt 2 ganger.
- Prøven ble dekket med perforert parafilm og satt til tørking i P_2O_5 -eksikator i minst 1 time før TMS-derivatisering.

5.5.2.2 TMS-derivatisering

Prinsipp (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2004)

Metylglykosider har polare grupper, hydroksylgrupper, og er dermed dårlig egnet for GC. De har lav flyktighet og kan dermed forårsake brede topper med haledannelse. For å kunne analysere disse på GC må de omdannes til termisk stabile og flyktige substanser. Dette kan oppnå med derivatisering. Ved å benytte tetrametylsilan (TMS) som reagens blir polare grupper i stoffene omdannet til upolare grupper, og stoffene blir til flyktige og termisk stabile derivater som er bedre egnet for GC. Eks på polare grupper kan være OH, COOH, NH_2 , og NH. Under derivatisering erstattes aktive H-atomer med en trimetylsilylgruppe.



Figur 5.7: Metylglykosider med og uten metylestergruppe reager med TMS-reagens. I reaksjonen blir aktive H-atomer i metyglykosidene erstattes med trimetylsilylgruppe (Ringerud, 2003).

Material

- Alle prøver fra metode 5.5.2.1

Reagenser

- TMS reagens 1 ml Trimetylklorasilan (Supelco)
 2 ml Heksametyl disilazan (Merck)
 5 ml vannfri pyridin (Merk)

Utstyr

- Brand Transferpettor pipette og syrevaskede SMI-rør
- Whirlimixer (Fisons)

Prosedyre

- a. 200 µl TMS-reagens ble tilsatt prøve og blandet godt.
- b. Prøven ble satt til henstand i romtemperatur i 0,5 time og var nå klar for injisering på GC.

5.5.2.3 GC-FID**Prinsipp** (Greibrokk et al., 2005)

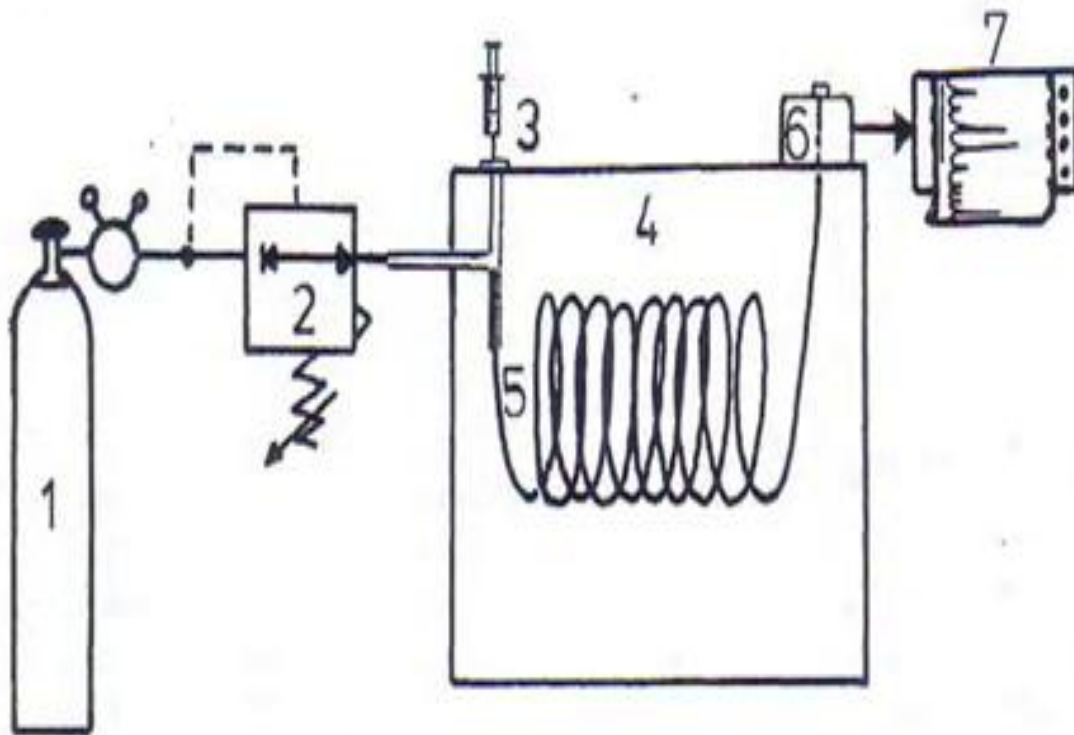
Gasskromatografi (GC) er en kolonnekromatografisk metode for analyse av stoffer i gassform. For at stoffer skal kunne separeres med GC må de være termisk stabile, lett flyktige samt hydrofobe. Prøven appliseres i en oppvarmet injektor hvor den fordamper straks til gass. Gassen fraktes inn og gjennom kolonnen av et inert transportmedium, som kalles for bære-gass.

I kolonnen blir stoffer fra prøven separert. Separasjonen er basert på fordeling av stoffene mellom bære-gassen og stasjonærfase, som er igjen avhengig av blant annet stoffenes egenskaper, kolonnetemperatur og bære-gasshastighet. Stasjonærfasen som brukes må være egnet for separasjonen. Det betyr at den skal være termisk stabil og ikke reagerer irreversibelt med prøven. Det finnes to typer stasjonærfase for GC.

Stasjonærfase med et adsorbsjonsmiddel (GSC) og stasjonærfase med en ikke-flyktig væske (GLC). Det er den sistnevnte som blir benyttet, siden GSC fortrinnsvis benyttes til å separere stoffer som er gasser ved normal romtemperatur.

Tiden de forskjellige stoffene bruker for å komme seg gjennom kolonnen blir registrert av en detektor. Ved bruk av flammeionisasjonsdetektoren (FID) dannes det ioner når prøven forbrennes. Detektoren sender informasjon videre i form av elektriske signaler til en integrator, som omdanner signalene til et kromatogram. En printer skriver ut kromatogrammet med forskjellige topper med verdiene for areal og retensjonstid. Arealene og retensjonstidene til toppene kan brukes til henholdsvis kvantitative og kvalitative bestemmelser av stoffer fra prøven.

Hvert monosakkarid kan eksistere i både pyranose- og furanoseform. I tillegg kan de foreligge i α - eller β -konfigurasjon og i åpen struktur eller lukket form. De ulike konformasjonene fra et bestemt monosakkarid vil fordele forskjellig mellom bæregassen og stasjonærfasen. Dette gir et karakteristisk mønster av topper med bestemte retensjonstider, som kan brukes til å identifisere monosakkaridene i prøven. Intern standard er tilsatt prøven for å korrigere for eventuelle tap og variasjoner under prøveopparbeidelse og analyse.



Figuren 5.8: En prinsippskisse for gasskromatograf: Bæregassen fra stålsylinder (1) strømmer via en reduksjonsventil (2) og videre inn i selve GC-en. I injektoren (3) blir gassen varmet opp og ført inn i kolonnen (5), som ligger kolonneovnen (4). Gassen blir deretter ført videre til detektoren (6) og ut i luften. En printer (7) skriver ut kromatogram.

Materiale

- Alle prøver fra metode 5.5.2.2

Utstyr:

- Gasskromatograf: Carlo Erba 6000 Vega Series 2.
- Integrator: Shimadzu C-R6
- Detektor: Flammeionisasjonsdetektor (FID) med hydrogengass og luft til flammen.
- Kolonne: DB-5 (J & W scientific) "Fused silica" kapillær kolonne
Lengde (25 m), indre diameter (0,32 mm) og filmtykkelse (0,25µm)
- Injektor: Splitt: splittless

Reagenser

- Bæregass: Heliumgass
- Skyllemiddel for sprøyte: Pyridin (Merck)

Betingelser:

- Flowhastighet: splitt flow (~1,8 ml/min), gjennom kolonne (1,8 ml/min)
- Injiseringvolum: 0,5-1 µl
- Injektortemperatur: 260 °C
- Detektortemperatur: 310 °C
- Temperaturprogram: 140 °C \rightarrow 1 °C/min \rightarrow 170 °C \rightarrow 6 °C/min \rightarrow 250 °C \rightarrow 30 °C/min \rightarrow 300 °C

Prosedyre:

- 0,5-1 µl prøve ble injisert via splittinjektor
- Sprøytespissen ble vasket seks ganger med pyridin før den kunne brukes til ny injeksjon.
- Temperatur-programmet tok ca. 55 minutter

5.6 Strukturoppklaring

5.6.1 Identifikasjon av AG-II med Yariv reagens test

Prinsipp: (Holst & Clarke, 1985)

På en gelbondfilm-overflate ble det dekket med en gelblanding, som var på forhånd tilsatt β -glykosyl-Yariv reagens (et rødt fargestoff). Etter at gelen hadde stivnet ble det stanset ut små brønner, til disse ble det applisert forskjellige prøver. Eventuelle AG-II i prøvene vil diffundere utover i gelblandingen, og reagerer spesifikt med β -glykosyl-Yariv reagenset. Reaksjonen resulterer et rødt utfelt bunnfall, i form av en rød ring rundt eventuelle brønner. De røde ringene kan leses kolorimetrisk og er et tegn for tilstedeværelse av AG-II i prøvene. For å kunne detektere AG-II i denne testen må det være minst 15 μ l AG-II i prøvene. Som standard ble det benyttet arabisk gummi.

Materiale

- Alle fraksjoner med unntak av 96E-Rå og 50V-1 (se figur 2.1)

Reagenser

- Standard løsning: 1 mg/ml Gum Arabica
- 2 mg/ml Yariv reagens løsning (Biosupplies)
- Gelblanding (for en plate): 35 mg agarose (Bio-rad), 30 mg natriumklorid (Prolabo), 0,7 mg natriumazid (Merck) og 3,5 ml destillert vann

Utstyr

- GelBond[®] film for agarosegel (GE Healthcare)
- Glassrør, kokeplate, glasskar og glassplate med vater
- Brand Transferpettor pipette og SMI-rør (50 μ l)
- Utstansingsrør med vannsug, Whatman papir og cellepapir

Prosedyre:

- a. En bestemt prøvemengde (1-1,5 mg) ble veid ut og løst i destillert vann, slik at konsentrasjon ble 8 mg/ml. Prøveløsning ble mikset godt.
- b. Gelbondfilm-plate ble klippet ut til en dimensjon på 5 x 7 cm og stilt i vater med den hydrofile siden vendt opp.

- c. Gelblanding ble veid i glassrør og varmet opp til kokepunktet
- d. 50 µl Yariv reagens løsning ble tilsatt gelblandingen og ristet godt.
- e. Gelblandingen ble helt utover på gelbondfilm-platen. Etter at gelen hadde stivnet, ble det laget små brønner ved hjelp av utstansingsør og vannsug.
- f. 2, 4 og 6 µl av standard og prøve ble applisert i hver sin brønn.
- g. Filterpapir i bunnen av et glasskar ble fuktet med destillert vann. Platen ble lagt i karet. Karet ble lukket og satt til henstand i 24 timer i romtemperatur.
- h. Platen ble tatt ut og lagt på en glassplate med gelsiden opp.
- i. Et fuktet whatmanpapir, 10 ark cellepapir og en glassplate ble lagt over flaten.
- j. En flaske med 2,5 L vann ble lagt på glassplaten og satt til henstand i 10 minutter.
- k. Cellepapiret ble snudd, alt ble satt på igjen og satt til henstand i 10 minutter.
- l. Platen ble skannet, og resultatene leses kolorimetrisk.

5.6.2 Bindingsbestemmelse

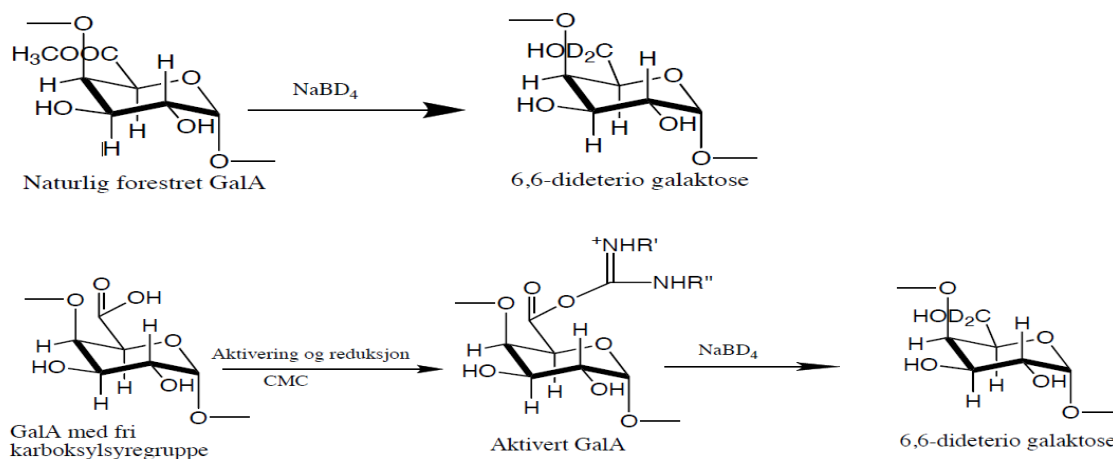
5.6.2.1 Karboksylsyrereduksjon

Prinsipp (Kim & Carpita, 1992)

Før metylering må esterifiserte og frie karboksylsyregrupper på galakturonsyreenhetene reduseres om man ønsker å identifisere bindingstypene deres ved GC-MS-analyse.

Esterifiserte uronsyrer kan reduseres direkte til primær alkoholer ved hjelp av NaBD₄, mens frie uronsyrer må aktiveres med carbodiimid før reduksjon med NaBD₄.

Reduksjonen av esterifiserte og frie uronsyrer gir 6,6-dideuteriosukre, som kan skilles fra nøytrale sukre ved GC-MS, siden de har fragmenter med molekylvekt M+2.



Figur 5.9: Den øverste likning viser reaksjonslikning for esterifiserte galakturonsyre, mens den nederste viser reaksjonslikning for fri karboksylgruppe på galakturonsyre (Opsahlseter, 2008)

Materiale

- 50E-Amb, 100V-N, 100V-S1
- 100V-S2, 100V-3, 100V-S4

Reagenser

- 500 mM imidazole-HCl (pH 8,0)
- NaBD₄ (Aldrich)
- Isedikk (Prolabo)
- Destillert vann
- 0,2 M MES (2-[N-Morpholino] etan svovelsyre) (Sigma)
- Carbodiimide (Sigma)
- 2 M TRIZMA (Tris[hydroksymetyl]aminometan), pH 9,0 (Sigma)
- Oktanol
- NaOH (AnalaR)

Utstyr

- Syrevaskede rundkolbe (25ml)
- Finnpiquette (1-5ml) og (200-1000µl) og (40-200µl)
- Knust is
- Rotavapor: RE (Büchi)
- Frysetørker: Alpha 1-4 (Christ)
- Varmeskap Functionline (Heraus Instruments)

Prosedyre

- 2-2,5 mg prøve ble veid inn i en 25 ml rundkolbe. Deretter ble den tilsatt 5 ml iskald 500 mM imidazole-HCl.
- 1ml (2 x 300µl + 400 µl) 100 mg/ml NaBD₄ (nylaget i 500nM imidazole-HCl) ble tilsatt for å redusere esterifiserte uronsyrer i prøven. Prøven ble mikset og satt til inkubering på is i 5 minutter de to første gangene. Den tredje gangen ble det mikset og inkubert 0,5 time på is.
- Overskuddet av reduktant i prøven ble ødelagt ved å tilsette 5 x 1 ml iseddik.
- Prøven ble så dampet inn på rotavapor til 2,5 ml.
- Prøven ble applisert på PD10 kolonne (5.3.3) og eluert med 3,5 ml destillert vann for å isolere høy molekulære fra lav molekulære substanser.

- f. Det høy molekylære eluatet ble frysetørket.
- g. Eluatet ble reløst i 1 ml destillert vann samt ble 200 µl 0,2M MES og 400 µl 500 mg/ml carbodiimide (nylaget i destillert vann) tilsatt.
- h. Prøven ble mikset og inkubert i 3 timer ved 26 °C i varmeskap.
- i. Prøven ble tilsatt 1 ml 2M TRIZMA og 2 dråper oktanol, så avkjølte på is.
- j. 1 ml 70 mg/ml NaBD₄ (nylaget i 0,05M NaOH) ble tilsatt.
- k. Prøven ble så inkubert i kjøleskapet (4 °C) over natten.
- l. Overskuddet av reduktant i prøven ble ødelagt ved langsom tilsetning 5 x 100µl iseddik.
- m. Prøven ble dampet inn på rotavapor til 2,5 ml.
- n. 10 ml destillert vann ble tilsatt i prøven og dampet til 2,5 ml for å fjerne oktanol.
- o. Forrige punkt (n) ble gjentatt 4 ganger.
- p. Prøven ble applisert på PD10 kolonnen (5.3.3) og eluert med 3,5 ml destillert vann for å isolere høy molekylære fra lav molekylære substanser.
- q. Det høy molekylære eluatet ble frysetørket.

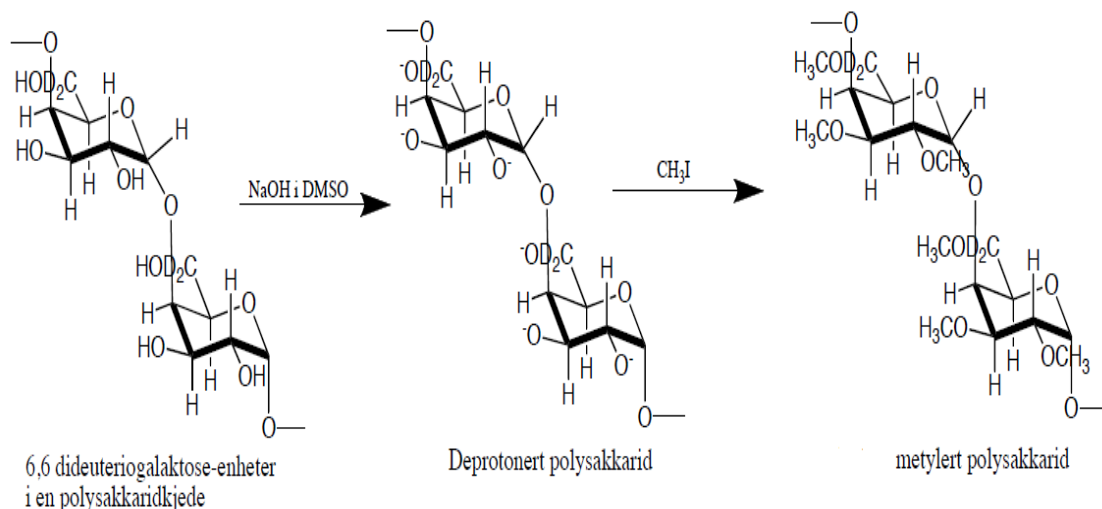
5.6.2.2 Metyleringsmetode

Prinsipp

Metyleringsmetoden utføres for å bestemme bindingsmønster til polysakkarider. Metoden er en omfattende analyse og består av følgende trinn: metylering, hydrolyse, reduksjon og acetylering samt GC-MS.

Metylering (Cui, 2005)

For å kunne skille frie OH-grupper fra OH-grupper som inngår i glykosidbindinger i polysakkarider kan vi utføre en metyleringsmetode. Frie hydroksylgrupper ioniseres først med en base (NaOH i DMSO), metyleres så med et metyleringsreagens (CH₃I), og frie OH-grupper blir dermed til O-Me-grupper.



Figur 5.10: Reaksjon likning for metylering, der fri OH-grupper i polysakkarider først blir ionisert, så blir metylert med CH_3I (Opsahlseter, 2008).

Materiale

Alle prøver fra metode 5.6.2.1

Reagenser

- DMSO-løsning (dimetylsufoksid-løsning) (Merck)
- NaOH-pellets, tørr (Merk)
- Metyljodid-løsning (Fluka)
- Natriumtiosulfat-5-hydrat (Merck)
- Kloroform (Prolabo)

Utstyr

- Agatmorter og pistill
- Ristemaskin: Vibrax-VXR (IKA Labortechnik)
- Syrevaskede metyleringsrør med skrukork, 40 ml
- Brand Transferpettor pipette og syrevaskede SMI-rør
- Finnpipette (1-5ml) og (200–1000 μl)
- Heliumgass inndamping oppsett: Reacti-ThermTM III Heating module (Pierce)
- Whirlimixer (Fisions)
- Sentrifuge: Heraeus Multifuge 4 KR
- Syrevaskede pasteturrpipetter
- Nitrogengass inndamping oppsett: Reacti-ThermTM III Heating module (Pierce)

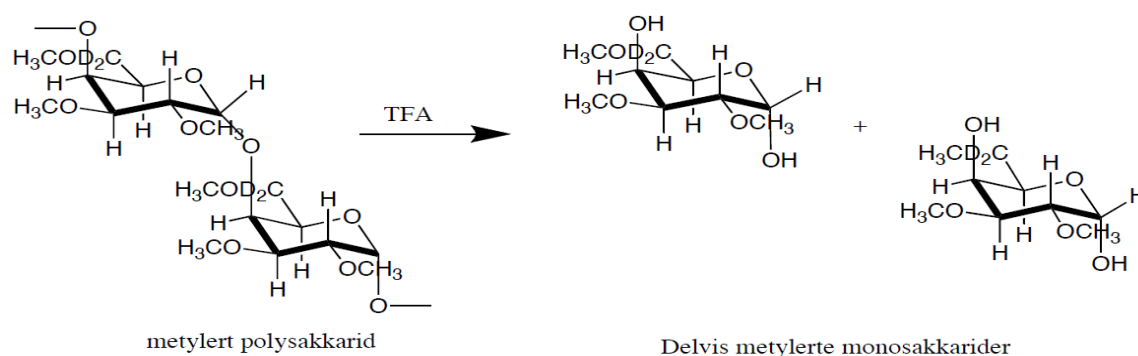
Prosedyre

- 1 ml DMSO ble tilsatt i prøven, så ristet i 20 minutter ved 200 rpm for å løse glykan.
- Løsningen ble overført til ”metyleringsrør”.
- 500 µl NaOH i DMSO-suspensjon (nylaget) ble tilsatt prøven ved hjelp av en SMI glasspipette. Suspensjonen ble laget ved å knuse 2 pellets NaOH pr. ml DMSO (120mg/ml) ved hjelp av morter og pistill
- Prøven ble blåst med heliumgass for å fjerne eventuelle interfererende gasser som var tilstede, så rystet i 40 minutter på rystemaskin ved 200 rpm.
- 100 µl metyljodid ble tilsatt prøven i avtrekk og rystet i 10 minutter ved 200 rpm.
- Punktet e ble gjentatt en gang.
- 200 µl metyljodid ble tilsatt prøven i avtrekk og rystet i 20 minutter ved 200 rpm.
- 10 ml 100 mg/ml natriumthiosulfat (nylaget i vann) og 2 ml kloroform ble tilsatt til prøven.
- Prøven ble mikset godt på whirlmikser (minst 40 sekunder) og sentrifugert i 3 minutter ved 1000 rpm for å separere fasene.
- Den øverste fasen (vannfasen) ble fjernet og kastet.
- Den gjenværende kloroformfasen ble vasket med 4 x 5 ml destillert vann. Vannfasen og mellomsjiktet ble fjernet med en pasteturrpipette.
- Ny pasteturrpipette ble brukt til å overføre kloroformfasen til et nytt metyleringsrør og blåst til tørrhet under nitrogengass.

5.6.2.3 Hydrolyse

Prinsipp (Cui, 2005)

De metylerte polysakkaridene hydrolyseres til monosakkarider ved hjelp av trifluoreddiksyre (TFA)



Figur5.11: Metylert polysakkarider hydrolyseres til delvis metylerte monosakkarider ved hjelp av TFA (Opsahlseter, 2008).

Materiale

- Alle prøver fra metode 5.6.2.2

Reagenser

- 2,5 M TFA (trifluoreddiksyre) (Merk)

Utstyr

- Finnpiquette (40-1000µl)
- Heliumgass inndamping oppsett: Reacti-Therm™ III Heating module (Pierce)
- Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments)
- Nitrogengass inndamping oppsett: Reacti-Therm™ III Heating module (Pierce)

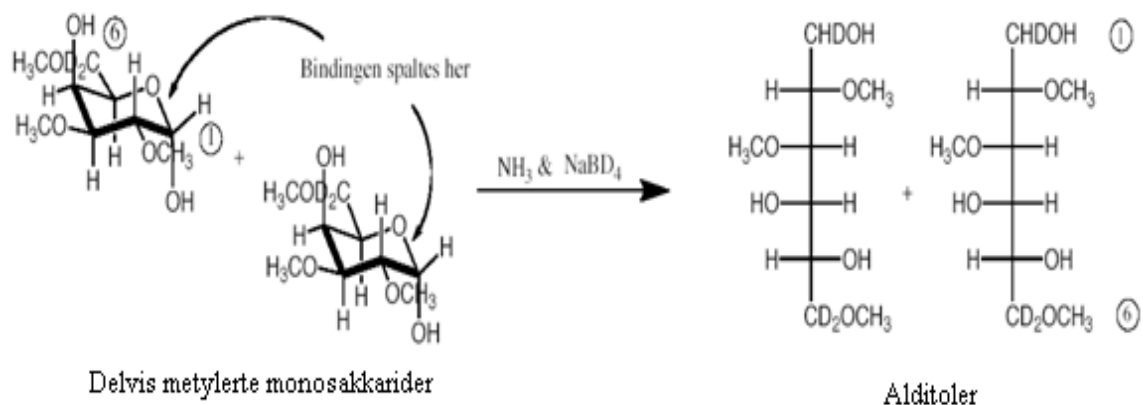
Prosedyre

- 500 µl 2,5M TFA ble tilsatt til metylerte prøven, så ble den blåst med heliumgass.
- Prøven ble hydrolysert i 2 timer ved 100 °C i varmeskapet.
- Prøven ble avkjølt på benken, så dampet til tørrhet under nitrogengass.

5.6.2.4 Reduksjon

Prinsipp (Cui, 2005)

Delvis metylerte monosakkarider reduseres til alditoler etter behandling med natriumborodeuterid (NaBD_4) under basisk forhold. NaBD_4 innfører et deuterium atom i det anomerisk karbonet og skiller dermed C1 fra karbonet C6. Ringåpning gjør monosakkarider mer flyktige.



Figur5.12: Delvis metylerte monosakkarider spaltes og reduseres til alditoler under basisk forhold.
(Opsahlseter, 2008)

Materiale

- Alle delvis hydrolyserte prøver 5.6.2.3

Reagenser

- 2 M NH_3 -løsning (Merck)
- NaBD_4 (Aldrich)
- Iseddik (Prolabo)
- 5 % eddiksyre i metanol
- Metanol (Chemiteknik)

Utstyr

- Ultralydbad: Bransonic 220
- Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments)
- Finnpiquette (40–200 μl)
- Nitrogengass inndamping oppsett: Reacti-ThermTM III Heating module (Pierce)

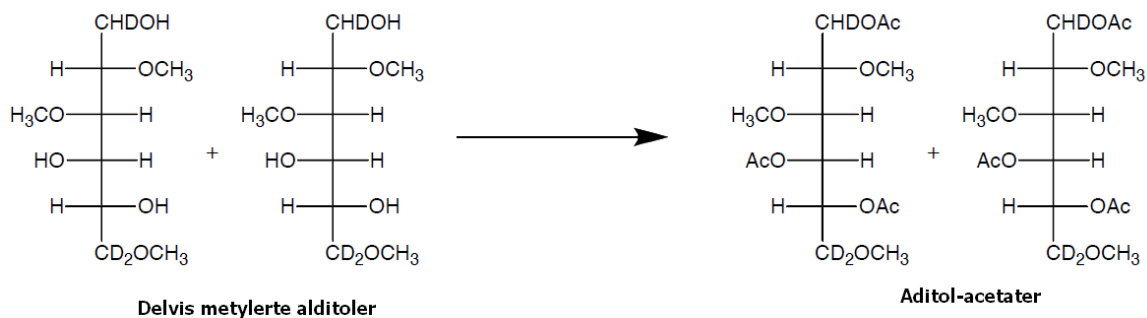
Prosedyre

- Hydrolyserte prøver ble tilsatt 500 μl 2M NH_3 , etterfulgt 500 μl 1M NaBDH_4 (nylaget i 2M NH_3).
- Prøven ble sonikert på ultralydbad ett minutt, så inkubert i varmeskapet i 60 minutter ved 60 °C.
- Overskuddet av reduktant i prøven ble ødelagt ved å tilsette 3 x 50 μl iseddik forsiktig.
- Prøven ble tørket under nitrogengass
- Prøven ble tilsatt 2,5 ml 5 % eddiksyre i metanol, så tørket under nitrogengass.
- Punktet e ble gjentatt.
- 2,5 ml metanol ble tilsatt i prøven, så ble den tørket under nitrogengass
- Punkt g ble gjentatt.

5.6.2.5 Acetylering

Prinsipp (Cui, 2005)

De delvis metylerte alditoler reduseres til alditol-acetater ved hjelp av eddiksyreanhydrid. Produktene som dannes er mer lipofile, samt inneholder acetylgruppe som gir bedret separasjon med GC-MS.



Figur 5.13: Acetylering reaksjon, de delvis metylerte alditoler reduseres til alditoler-acetater. (Opsahlseter, 2008).

Materiale

- Alle prøver metode 5.6.2.4

Reagenser

- 1-metylimidazole (Sigma)
- Eddiksyreanhydrid (Merck)
- Destillert vann
- Diklormetan (Merck)
- Vannfri metanol (FI)

Utstyr

- Finnpiquette (200–1000 µl) og (1-5 ml)
- Whirlimixer (Fisions)
- Sentrifuge: Heraeus Multifuge 4 KR
- Syrevaskede pastetupipetter
- Syrevaskede metyleringsrør
- Syre vaskede supelcorør med kork
- Nitrogengass inndamping oppsett: Reacti-Therm™ III Heating module (Pierce)
- Brand Transferpettor pipette og syrevaskede SMI-rør

Prosedyre

- a. 200 µl 1-metylimidazole ble tilsatt til den reduserte prøven, etterfulgt med 2 ml eddiksyreanhydrid.
- b. Prøven ble mikset godt og satt til henstand i 10 minutter i romtemperatur.
- c. 10 ml destillert vann ble tilsatt prøven for å ødelegge overskuddet eddiksyreanhydrid. Prøven ble mikset godt og satt til henstand i 10 minutter i romtemperatur.
- d. Delvis metylerte monosakkarider ble så ekstrahert med 2 x 1ml diklormetan. Løsningen ble mikset godt på (minst i 30 sekunder), så sentrifugert i 3 minutter ved 1000 rpm.
- e. Den nederste fasen fra begge ganger ble tatt ut med en pasteturpipette og overførte til et metyleringsrør.
- f. Ekstraktet ble tilbakevasket med 2 x 5ml destillert vann. Både den øverste fasen og mellomsjiktet ble fjernet før en ny pasteturpipette ble brukt til å overføre den nederste fasen (diklormetan) til et supelcorør.
- g. Prøven ble dampet til tørrhet under nitrogengass.
- h. 50 µl vannfri metanol ble tilsatt for å løse residuet før injeksjon på GC-MS.

5.6.2.6 GC-MS

Prinsipp (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2004)

De delvis metylerte alditol-aceter separeres og detekteres med GC-MS. I GC-kolonnen blir disse forbindelser separert. Når de kommer inn i et massespektrometer blir de bombardert med elektroner under vakuum. Forbindelsene ioniseres og spaltes til mindre fragmenter. Både molekylionet og eventuelle fragmenter som dannes, akselereres så inn i en masseanalysator. Her blir de separert etter forholdet mellom masse og ladning. Hvert ion og fragment gir et unikt og karakteristisk massespekter. Tolker vi disse spektrene kan vi få informasjon om bindingsmønsteret til polysakkaridene.

Materiale

- Alle prøver fra metode 5.6.2.5

Betingelser

- Flowhastighet: 1ml/ml
- Injektortemperatur: 250 °C
- Temperaturprogram: 80 °C(5min) \rightarrow 20°C/min \rightarrow 170° C \rightarrow $0,5^{\circ}\text{C/min}$ \rightarrow 200° C \rightarrow 30°C/min \rightarrow 280 °C (20 min)

Utstyr

- Gasskromatograf: 8000 series (Fisons)
- Detektor: Massespektrometer Fisons MD-800
- Injektor: Splitt (1:10)
- Kolonne: Factor four kolonne, VF-Ims (upolar)
Lengde (30 m), indre diameter (0,25 mm) og filmtykkelse (0,25µm)

Prosedyre.

- a. Prøven ble injisert og massespektrometer ble tatt opp.

6. Resultater og diskusjon

6.1 Preparering og ekstraksjon av bærmateriale

6.1.1 Preparering av svartsurbær-materiale

Utgangsmaterialet var frosne svartsurbær fra Rune Slimestad, Plantchem. Bærene ble ekstrahert med diklormetan og 96 % etanol for å fjerne vekk upolare forbindelser og lavmolekylære substanser som fenoliske syrer og salter. En del vann i bærmaterialet ble også trukket ut i 96 % ekstraksjonen, noe som lettet tørkingen. Bærmaterialet ble så tørket og pulverisert, mens 96 % etanolekstrakt ble oppkonsentrert og brukt til videre ekstraksjon. Konsentratet var sterkt lilla og litt seig.

6.1.2 Ekstraksjon med etanol og vann

Pulverisert bærmateriale ble ekstrahert med 96 % etanol. Her ble salt, pigment, organisk syre, lavmolekylært sukker og protein ekstrahert fra bærematerialet. Dette ekstraktet ble kalt for 96E-Rå, det hadde en sterk lilla farge, tilnærmet svart. En del av ekstraktet ble frysetørket og undersøkt i kommende tester. Residuet fra 96 % etanolekstraksjon ble så ekstrahert med 50 % etanol. Ekstraksjonen trakk ut litt mer polare substanser enn i 96 % etanolekstraksjon, fordi 50 % etanol har en høyere polaritet. Materialet ble ekstrahert, sentrifugert og filtrert flere ganger, før de ble slått sammen og kalt 50E-Rå. Det kan nevnes at noe materiale gikk tapt ved filtrering på grunn av at løsningen var viskøs. Vannløselige polysakkarider i residuet fra 50 % etanolekstraksjonen ble så ekstrahert ut med 50 °C vann og deretter 100 °C vann. Vann med ulik temperatur ekstraherte ut forskjellige polysakkarider, fordi løselighet til disse polysakkaridene er betinget av temperatur. 50 °C vannekstrakt og 100 °C vannekstrakt ble sentrifugert, filtrert og kalt for henholdsvis 50V-Rå og 100V-Rå. Ekstraktene ble frysetørket og undersøkt i senere tester.

Ekstrakter	96E-Rå	50E-Rå	50V-RÅ	100V-Rå
Konsentrasjon	-	1,24 mg/ml	0,31 mg/ml	1,40 mg/ml
Mengde	Ca.7,0 liter	Ca.48,1 g	Ca.2,4 g	Ca.5,3 g

Tabell 6.1: Konsentrasjon og stoffmengde av råekstraktene fra ulike ekstraksjonstrinner.

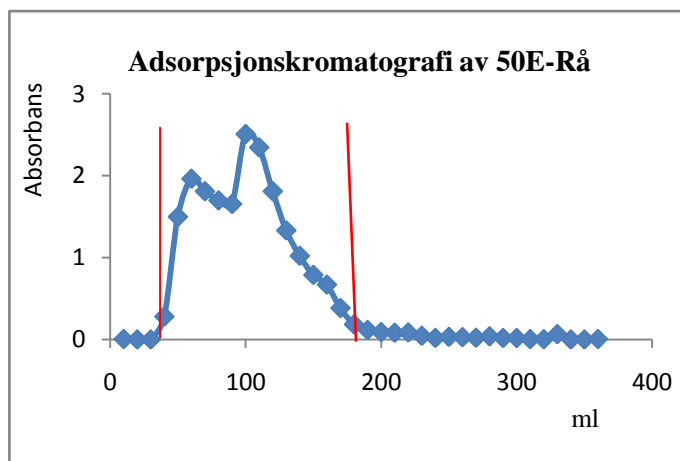
6.2 Opprensing og separering av polysakkarider

6.2.1 Absorpsjonskromatografi med amberlite XAD-7HP kolonne

50E-Rå ekstraktet var sterkt lillafarget, noe som kan tyde på at ekstraktet inneholder mye antocyaniner. For å separere fargestoffene (antocyaniner) fra resten av 50E-råekstraktet, ble det benyttet adsorpsjonskromatografi (XAD-7HP-kolonne). Fargestoffer i ekstraktet har affinitet til kolonnematerialet og binder seg til dette. Eventuelle polysakkarider i ekstraktet binder ikke til kolonnematerialet og ble derfor eluert ut med vann. Fargestoffer ble eluert ut med metanol, aceton:vann eller 0,1 % TFA i metanol.

Fordi Amberlite XAD-7HP-kolonnen har en kapasitet opptil 20 ml eller et gram stoff, måtte 50E-Rå oppkonsentreres før applisering på kolonnen. 10 liter 50E-Rå ble oppkonsentrert til 250 ml. Det gir et konsentrat med en konsentrasjon på 47,4 mg/ml, noe som er godt egnet for kolonnekjøring. 20 ml konsentrat ble applisert og eluert med vann. Det ble utført 12 paralleller. Elueringen gikk sakte fordi konsentratet var litt viskøst. Vanneluatet fra hver eluering ble testet for karbohydratinnhold med fenol-svovelsyretest og det ble laget en karbohydratprofil (figur 6.1). Basert på denne profilen ble de fraksjonene som inneholdt karbohydrat slått sammen til en fraksjon, kalt for 50E-Amb. Et metanoleluat ble også samlet og kalt for 50E-Met.

Teoretisk skulle ikke fargestoffer (antocyaniner) komme ut når det ble eluert med destillert vann. Likevel var vanneluatet farget, noe som kan tyde på at en del av fargestoffene absorberte ikke til kolonnematerialet. Årsaken kan være at kolonnen var overbelastet eller at noen fargestoffer ikke hadde affinitet til kolonnematerialet.



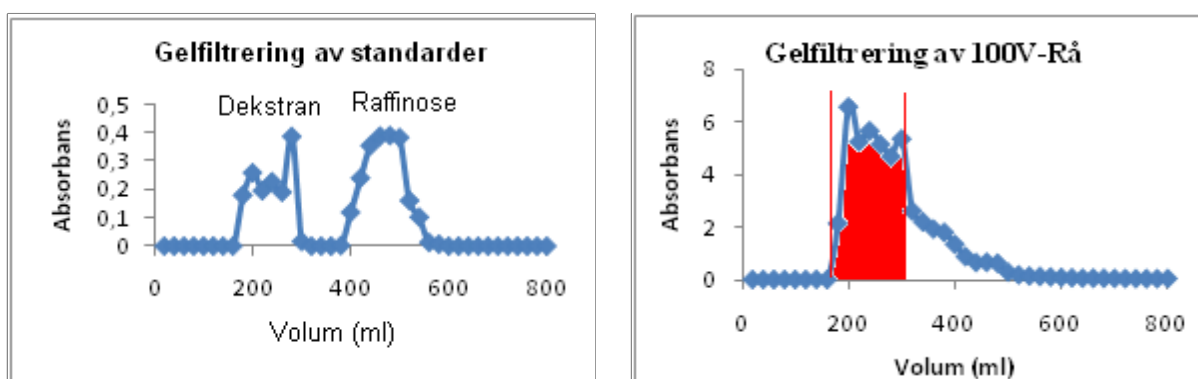
Fraksjon	50E-Amb	50E-Met
Konsentrasjon (mg/ml)	0,83	-
Mengde	2158 mg	2,5 liter

Figur 6.1: Et eksempel av en karbohydratprofil fra Amberlite-XAD-7HP-kolonne. Tabell 6.2: Viser konsentrasjon og stoffmengde til de to fraksjonene etter absorpsjonskromatografi.

6.2.2 Gelfiltrering med Bio-Gel P-6 DG kolonne

Gelfiltrering med Bio-Gel P-6 DG kolonne er en metode der stoffer blir separert etter molekylstørrelse. 50E-Amb, 50V-Rå og 100V-Rå ble først oppkonsentrert, så separert på denne kolonnen, ettersom de består av høymolekylære, intermediärmolekylære og lavmolekylære substanser. Hensikten var å isolere høymolekylære polysakkarider fra andre forbindelser, og samtidig rense fraksjonene for eventuelle rester av fargestoffer. Fraksjonen 50E-Amb hadde fremdeles mye fargestoffer etter absorpsjonskromatografi, en stor del av disse fargestoffene bandt seg irreversibel til gelkolonnens pakkemateriale.

En standardløsning bestående av dekstran og raffinose ble først eluert gjennom kolonnen for å vise elueringsvolumene til henholdsvis høymolekylære og lav molekylære substanser. Standardenes karbohydratprofil fra fenol-svovelsyretesten viste god separasjon av høymolekylære og lavmolekylære standarder (figur 6. 2). 100 ml prøve ble applisert på kolonnen og eluert med destillert vann. Det ble utført to paralleller av hver prøve. Vanneluatet ble testet for karbohydratinnhold med fenol-svovelsyretest og det ble laget karbohydratprofil. Ved å sammenlikne profilen med standardenes karbohydratprofil, ble vanneluatet fra hver prøve delt inn i tre fraksjoner: 1. høymolekylære substanser, 2. intermediärmolekylær substanser og 3. lavmolekylære substanser. Bare den første fraksjonen (høymolekylære substanser) fra hver prøve ble bearbeidet videre med ionebytterkromatografi. Fraksjonene ble kalt for 50E-Gel, 50V-Gel og 100V-Gel.



Figurer 6.2 og 6.3: Figuren til venstre viser karbohydratprofil til standarder, mens den til høyre viser karbohydratprofil for fraksjonen 100V-Gel.

Fraksjon	50E-Gel	50V-Gel	100V-Gel
Konsentrasjon	2,74 mg/ml	0,93 mg/ml	5,21 mg/ml
Mengde	986,4 mg	353,4 mg	1927,7 mg

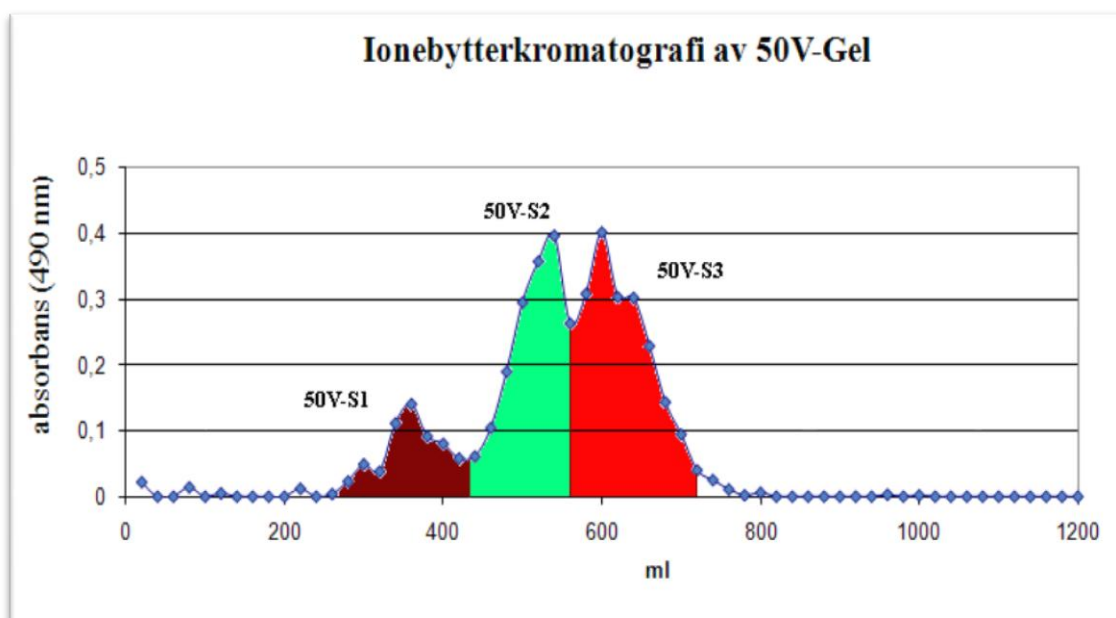
Tabell 6.3: Viser konsentrasjon og stoffmengde av de ulike fraksjonene etter gelfiltrering.

6.2.3 Ionebytterkromatografi med ANX Sepharose 4 Fast flow

Fraksjonene 50E-Gel, 50V-Gel og 100V-Gel består av nøytrale og sure polysakkarider. Med ANX Sepharose 4 Fast flow kolonne kan man separere nøytrale polysakkarider fra sure, samt separere de sure polysakkaridene etter surhetsgrad ved å bruke NaCl-gradient.

200 ml prøve fra disse tre fraksjonene ble applisert på kolonnen. Destillert vann ble benyttet til å eluere ut nøytrale polysakkarider først. Vanneluat fra 50E-Gel, 50V-Gel og 100V-Gel ble kalt for henholdsvis 50E-N, 50V-N og 100V-N. Sure polysakkarider ble så eluert ut med 0-2M NaCl-løsning. Disse eluatene ble testet med fenol-svovelsyretest. Basert på karbohydratprofilen ble de fraksjonert. Eluatet fra 50E-Gel ga fire fraksjoner, de ble kalt for: 50E-S1, 50E-S2, 50E-S3 og 50E-S4. Eluatet fra 50V-Gel ga tre fraksjoner, de ble kalt for: 50V-S1, 50V-S2 og 50V-S3. Eluatet fra 100V-Gel ga fire fraksjoner, de ble kalt for: 100V-S1, 100V-S2, 100V-S3 og 100V-S4. Disse fraksjonene inneholdte mye salt. De ble derfor først dialysert, så frysetørket og undersøkt i kommende tester.

Fenol-svovelsyretesten viste at det ikke var karbohydrat i 2M NaCl-eluatet, dette tyder på at karbohydratene ble eluert ut med 0-2 M NaCl-løsning. Utbytte vises i tabell 6.4.



Figur 6.4: Basert på karbohydratprofilen fra fenol-svovelsyretest ble sure polysakkarider til 50V-Gel etter ionebytterkromatografi delt inn i tre fraksjoner: 50V-S1, 50V-S2 og 50V-S3.

Fraksjon	50E-N	50E-S1	50E-S2	50E-S3	50E-S4
Konsentrasjon	94,5 µg/ml	5,0 µg/ml	31,5 µg/ml	370,6 µg/ml	191.9 µg/ml
Mengde	58,1 mg	0,75 mg	4,1 mg	63,0 mg	61,4 mg
Fraksjon	50V-N	50V-S1	50V-S2	50V-S3	
Konsentrasjon	122,5 µg/ml	68,9 µg/ml	559,2 µg/ml	352,7 µg/ml	
Mengde	65,0 mg	13,1 mg	67,1 mg	52,9 mg	
Fraksjon	100V-N	100V-S1	100V-S2	100V-S3	100V-S4
Konsentrasjon	944,7 µg/ml	40,0 µg/ml	361,8 µg/ml	1216,8 µg/ml	614,0 µg/ml
Mengde	500,7 mg	4,8 mg	61,5 mg	231,2 mg	92,1 mg

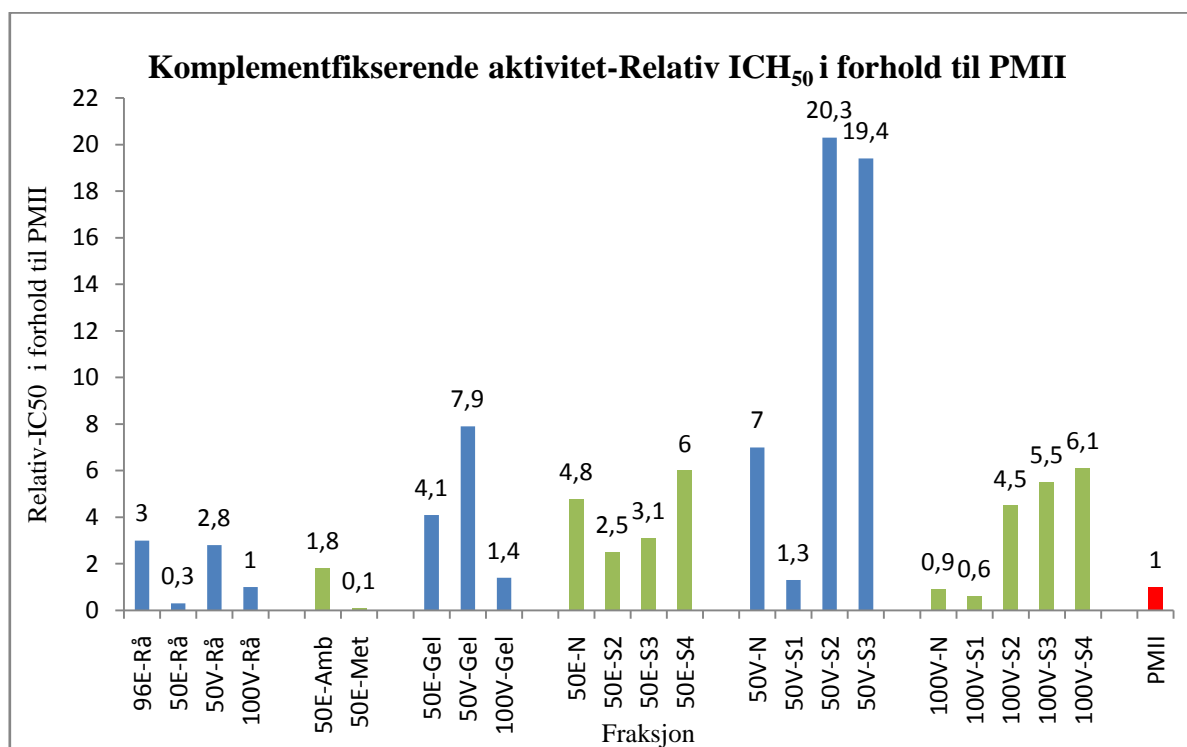
Tabell 6.4: Konsentrasjon og stoffmengde til de ulike fraksjonene etter ionebytterkromatografi og dialyse.

6.3 Biologisk aktivitet

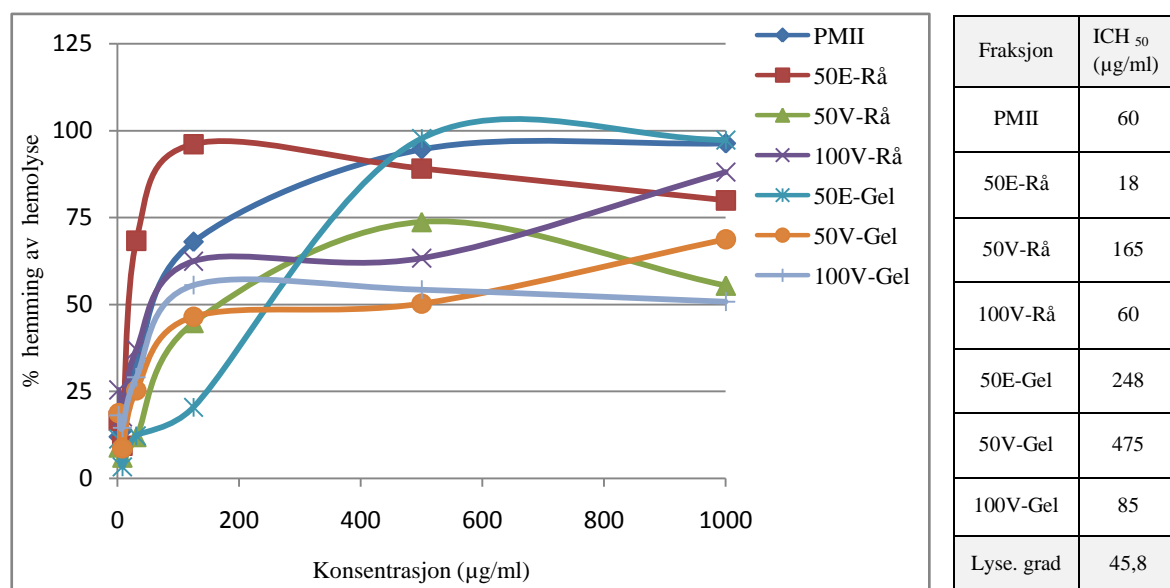
6.3.1 Komplementfikserende test

Plantepolysakkarider har vist en rekke immumodulerende effekter, blant annet påvirker de komplementsystemet. Komplementfikserende aktivitet blir målt ved hemming av hemolyse av sensibiliserte røde blodceller fra sau. PMII ble brukt som standard, fordi dens komplementfikserende aktivitet er veldokumentert (Michaelsen et al., 2000).

Destillert vann ga 100 % hemolyse og ble brukt som positiv kontroll. Med unntak av 50E-S1 ble alle fraksjoner testet for komplementfikserende aktivitet. Aktiviteten til de forskjellige fraksjonene og PMII uttrykkes som ICH_{50} , som er den minste konsentrasjon av prøve som trengs for å gi 50 % hemming av hemolyse. Ulike faktorer kan gi variasjon i testsystemet, ettersom testen ble utført på to forskjellige dager. For å kunne sammenligne aktiviteten mellom de forskjellige fraksjonene ble det benyttet relativ ICH_{50} , som er et forholdstall mellom fraksjon- ICH_{50} og PMII- ICH_{50} . Et relativ ICH_{50} som er mindre enn 1 betyr at prøven har høyere komplementfikserende aktivitet enn PMII, motsatt blir det dersom prøven har en verdi større enn 1. Figur 6.5 viser det relative ICH_{50} i forhold til standard.

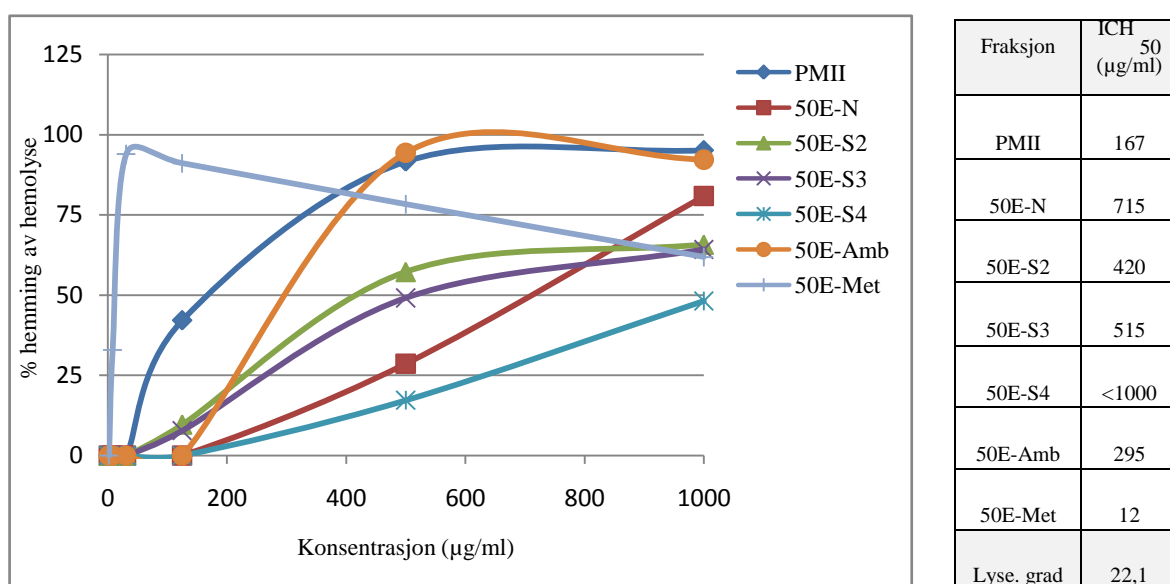


Figur 6.5: Relativ- ICH_{50} til forskjellige fraksjoner fra svartsurber. Gjennomsnittverdien av alle PMII- ICH_{50} er satt til 1.

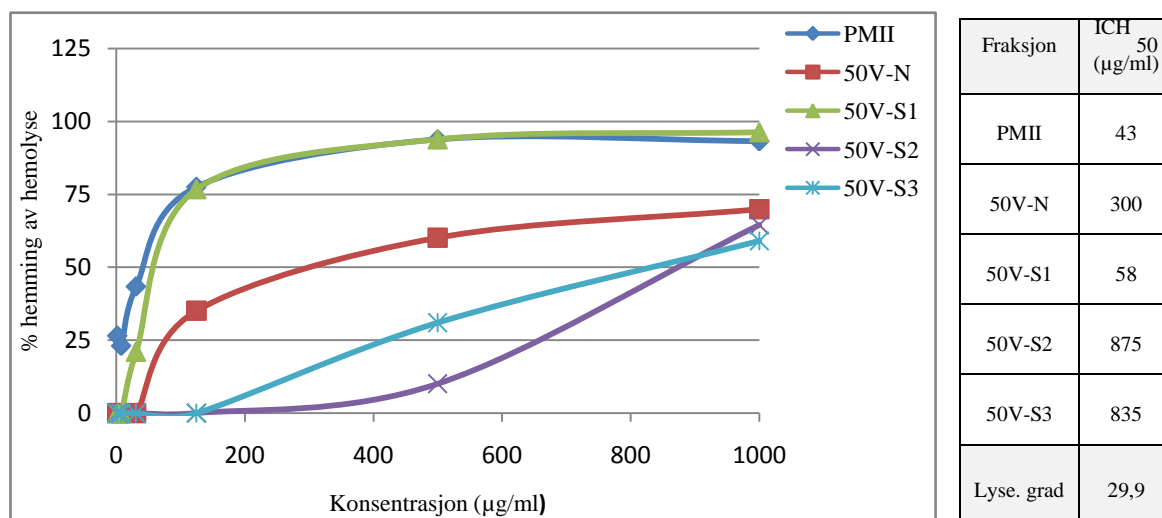


Figur 6.6: Hemolysehemming i % for ulike fraksjoner. ICH₅₀- verdier og lyseringsgrad viser til høyre.

Figur 6.6 viser komplementfikserende aktivitet for rækstrakter og fraksjoner etter gelfiltrering. Lyseringsgraden (45,8%) ligger innenfor det anbefalte området (30–60%), en indikasjon på at testen var utført tilfredsstillende. 50E-Rå og 100V-Rå viste henholdsvis høyere og lik aktivitet som PMII, mens andre fraksjoner viste lavere aktivitet enn PMII. Figur 6.7 viser resultatene for fraksjonene etter absorpsjonskromatografi og etanolfraksjonene etter ionebytterkromatografi. 50E-Met viste høyere aktivitet enn PMII, mens andre fraksjoner var mindre aktive enn PMII. Lyseringsgraden ligger utenfor det anbefalte området, noe som kan tyde på at disse resultatene var noe usikre.

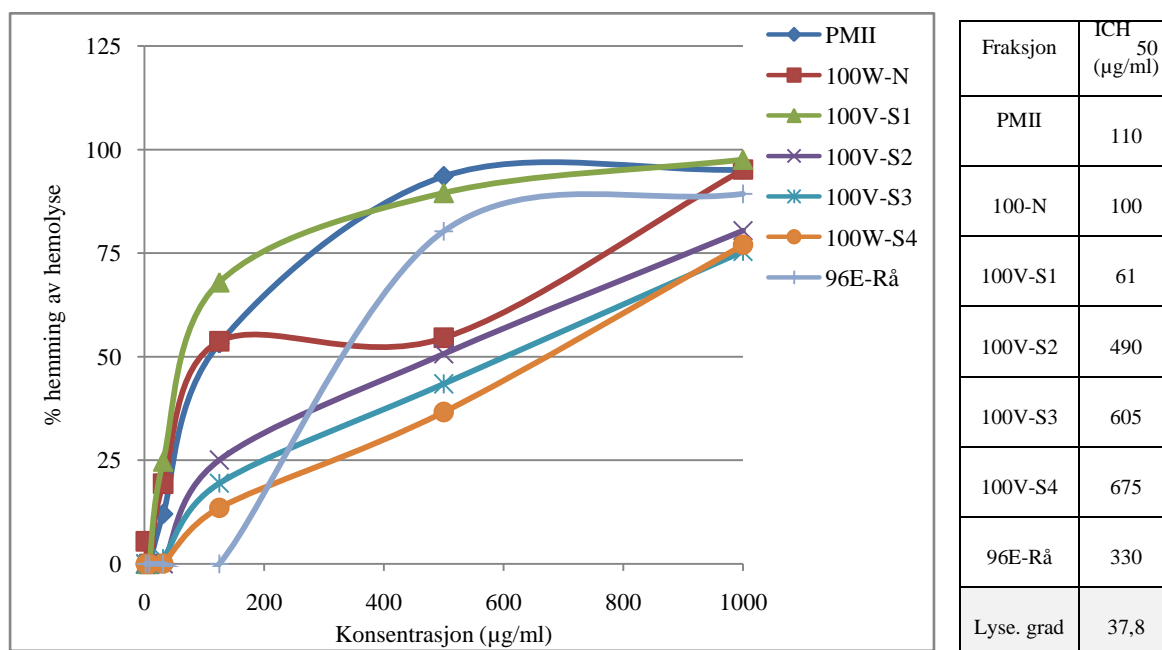


Figur 6.7: Hemolysehemming i % for ulike fraksjoner. ICH₅₀- verdier og lyseringsgrad viser til høyre.



Figur 6.8: Hemolysehemming i % for ulike fraksjoner. ICH₅₀- verdier og lyseringsgrad viser til høyre.

Figur 6.8 viser komplementfikserende aktivitet for 50 °C vannfraksjonene etter ionebytterkromatografi. Lyseringsgraden ligger nær det anbefalte området. 50V-S1 viste høyest aktivitet blant alle fraksjoner, men aktiviteten var mindre enn PMII. ICH₅₀-verdiene for de andre fraksjonene var høye sammenlignet med PMII, de hadde dermed lavere aktivitet enn PMII. Figur 6.9 viser resultatene for 100 °C vannfraksjonene fra ionebytterkromatografi samt 96E-Rå. Lyseringsgraden ligger innenfor det anbefalte området. Både 100V-N og 100V-S1 har en ICH₅₀-verdi som er lavere enn PMII, det betyr at de hadde høyere aktivitet enn PMII. Andre fraksjoner viste lavere aktivitet enn PMII.



Figur 6.9: Hemolysehemming i % for ulike fraksjoner. ICH₅₀- verdier og lyseringsgrad viser til høyre.

6.3.2 Antimikrobiell test

Det er beskrevet at svartsubbærsaft har bakteriostatisk effekt mot *S. aureus* og *E. coli* (Valcheva-Kuzmanova & Belcheva, 2006). Derfor er det ønskelig å teste effekten av noen fraksjoner fra svartsubbær på bakteriene *E.coli*, *S.aureus* og *P. aeruginosa* og i soppen *C.albicans*. Disse mikroorganismene er interessante å teste, fordi de er patogene og kan dermed forårsake infeksjon.

Råekstrakter og fraksjoner etter absorpsjonskromatografi og gelfiltrering ble valgt til å testes for antimikrobiell effekt, ettersom de antakelig vil inneholde varierende substanser, blant annet fenoliske forbindelser. Fraksjonenes antimikrobielle aktivitet ble målt med Agardiffusjons-metode. Metoden skiller ikke mellom hemmende og drepende effekt. Fraksjonenes aktivitet ble sammenlignet med de positive kontrollene gentamicin og amphotericin for henholdsvis bakterier og sopp. Metanol ble brukt som negativ kontroll.

Alle agarskåler hadde jevn vekst av mikroorganismer. Ingen hemmingssone ble observert i den negative kontrollen, mens tydelige hemmingssoner ble observert i de positive kontrollene. Dette indikerer at testen var tilfredsstillende utført, og at resultatene ikke var tilfeldige. Testen ble utført med tre paralleller, og resultatene fra hver parallell var noenlunde lik. Gjennomsnittsverdien ble beregnet ut og er presentert i tabeller 6.5 og 6.6.



Figur 6.10: Fraksjonene 50E-Rå, 50E-Met og 96E-Rå hemmet veksten av *Staphylococcus aureus*, men hemmingssonene var betydelig mindre enn positiv kontrollen gentamicin.

	E.coli <i>Hemmingssone måles i diameter</i>	P. aeruginosa <i>Hemmingssone måles i diameter</i>	S. aureus <i>Hemmingssone måles i diameter</i>	C. albicans <i>Hemmingssone måles i diameter</i>
P. kontroll	20,0 mm	16,7 mm	22,6 mm	8,0 mm
96E-Rå	-	10,0* mm	2,0 mm	-
50E-Rå	-	2,0* mm	7,3 mm	2,0* mm
50V-Rå	-	-	-	-
100V-Rå	-	-	-	2,0*mm
50E-Met	-	6,7* mm	4,0 mm	-
N. kontroll	-	-	-	-

Tabell 6.5: Viser antimikrobiell effekt for de forskjellige fraksjonene. Effekten vises som en hemmingssone.

* Bare redusert vekst rundt appliseringspunktet ble observert, men ingen hemmingssone.

	E.coli <i>Hemmingssone måles i diameter</i>	P. aeruginosa <i>Hemmingssone måles i diameter</i>	S. aureus <i>Hemmingssone måles i diameter</i>	C. albicans <i>Hemmingssone måles i diameter</i>
P. Kontroll	20,0 mm	16,7 mm	22,0 mm	8,0 mm
50E-Amb	-	-	2,0 mm	-
50E-Gel	-	-	-	-
50V-Gel	-	-	-	-
100V-Gel	-	-	-	-
N. kontroll	-	-	-	-

Tabell 6.6: Det ble bare observert hemmingssoner for kontrollene. Ingen aktivitet ble observert for fraksjonene .

S.aureus: Det ble observert hemmingssoner (figur 6.10) for 50E-Rå (7,3 mm), 50E-Met (4,0 mm), 96E-Rå (2,0 mm) og 50E-Amb (2,0 mm). Disse var mindre enn hemmingssonen til gentamicin (22,6 mm), noe som kan bety at disse fraksjonene hadde mindre effekt mot *S.aureus* enn gentamicin. Resultatene stemmer med det som har vært beskrevet i litteraturen, at svarturbærssaft har bakteriostatisk effekt mot *S. aureus*. Fraksjonene etter gelfiltrering ga verken redusert eller hemmede vekst av *S.aureus*. Dette

kan bety at de fraksjonene som inneholder mer av høymolekylære substanser kan ha mindre effekt, og at effekten kan ha sammenheng med f. eks fenoliske forbindelser.

E.coli: Det ble ikke observert noen hemmingssone (figur 6.11) eller redusert vekst rundt appliseringspunktene for de forskjellige fraksjoner, noe som kan bety at veksten av *E.coli* ikke ble hemmet eller redusert. Dette stemmer ikke overens med det som har blitt skrevet, at svartsurbær har bakteriostatisk effekt mot *E.coli*. Det er fortsatt uvisst om de fraksjoner som ikke ble testet er ansvarlige for den bakteriostatisk effekten mot *E.coli* som svartsurbær har. Et eksempel er diklormetanekstrakt som inneholder lipofile forbindelser, men også andre lavmolekylære substanser.

P.aeruginosa: Redusert vekst av bakterien ble observert rundt appliseringspunktene for 96E-Rå (10,0 mm), 50E-Rå (2,0 mm) og 50E-Met (6,7 mm). De har dermed mye mindre effekt enn positiv kontroll, som hadde vist en hemmingssone på 16,7 mm.

C.albicans: Det ble ikke observert noen hemmingssone rundt appliseringspunktene for noen av fraksjonene, bare redusert vekst av soppen ble observert for 50E-Rå (2,0 mm) og 100V-Rå (2,0 mm). For amphotericin (positiv kontroll) ble det observert en hemmingssone på 8,0 mm rundt appliseringspunktet. Dette betyr at soppens vekst bare ble hemmet av amphotericin, mens fraksjonene 50E-Rå og 100V-Rå bare reduserte veksten. Amphotericin har dermed mye større effekt enn fraksjonene fra svartsurbær.



Figur 6.11: Ingen fraksjoner hemmet vekst av *Escherichia coli*, det resulteres dermed ingen hemmingssone. Det ble derimot observert hemmingssone i positiv kontroll (amphotericin).

6.3.3 Påvirking på CYP3A4 + b5 - Metabolisme av midazolam

Prøver	Hemmet metabolismen av midazolam til 1-OH-midazolam	Hemmet metabolismen av midazolam til 4-OH-midazolam
Positiv kontroll	0 %	0 %
96E-Rå	95 %	96 %
50E-Rå	100 %	100 %
50V-Rå	25 %	43 %
100V-Rå	59 %	65 %
50E-Amb	96 %	96 %
50E-Met	99 %	100 %
50E-Gel	87 %	90 %
50V-Gel	15 %	35 %
100V-Gel	10 %	28 %

Tabell 6.7: Hemming av midazolams metabolisme i %. Beregningen er basert på to hovedmetabolitter: 1-OH-midazolam og 4-OH-midazolam. Det er antatt at midazolam i positive kontrollen metaboliseres tilnærmet 100 % til disse to metabolittene, slik at prosentvis hemmingen av metabolisme er satt til 0 %.

Frukt og bær har vist å kunne påvirke aktiviteten til CYP-enzym, og dermed legemiddelmetabolisme. Oftest er det de lavmolekylære substanser som er ansvarlige for denne påvirkningen. Svartsurbær inneholder mye lavmolekylære substanser som f. eks antocyaniner. Folk bruker svartsurbærprodukter i økende grad, dermed er det ønskelig å undersøke om svartsurbær kan påvirke legemiddelmetabolisme.

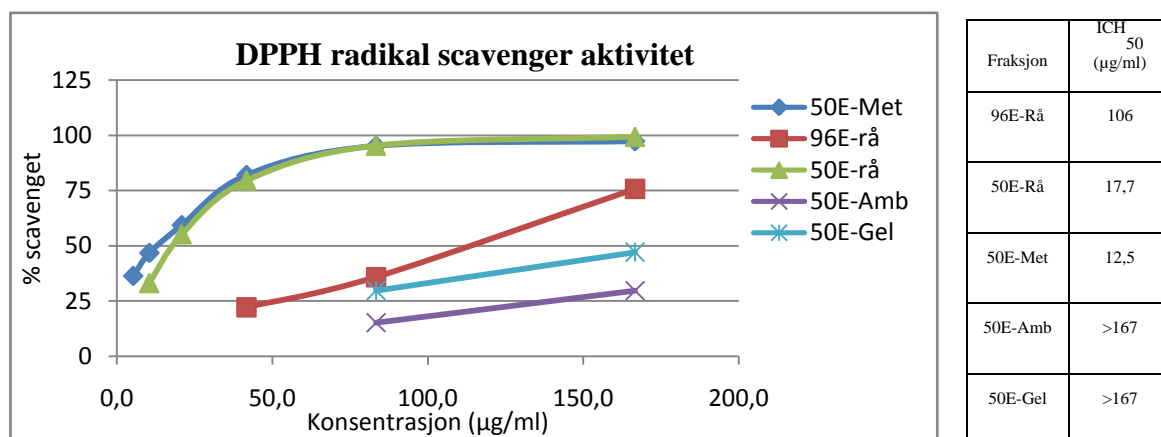
Fraksjonene etter absorpsjonskromatografi og gelfiltrering, i tillegg til rækstrakter ble undersøkt. Det er stor variasjon i innholdet av disse fraksjonene, noen inneholder høymolekylære forbindelser og andre rikelige mengder med lavmolekylære substanser. Forsøket ble utført med en metode utviklet av Postvoll. I utgangspunktet er metoden dårlig egnet for analyse av prøver med innhold av høymolekylære polysakkarider, fordi de kan karamellisere og dermed forurens apparaturen. Metoden ble av den grunn modifisert, og tilsetning av iskald etylacetat ble innført som ett ekstra trinn. Etylacetat stanset metabolismen av midazolam, samtidig som det resulterte i to faser: upolar fase og polar fase. Midazolam og dens metabolitter ble ekstrahert over i den upolare etylacetaten, mens proteiner og polysakkarider forble i den polare vannfasen. Etylacetatfasen ble dampet inn til tørrhet, så gjenoppløst i mobilfase. Deretter ble intern standard (diazepam)

tilsatt for å korrigere eventuelle variasjoner under LC/MS-kjøringen. Resultatene fra de ulike fraksjoner er presentert i tabell 6.7. Midazolam i den positive kontrollen ble tilnærmet fullstendig metabolisert. Prosentvis hemming for metabolitter: 1-OH-midazolam og 4-OH-midazolam ble tilnærmet lik 0 %. Prosentvis hemming for andre fraksjoner beregnes ut fra positiv kontroll. Fraksjoner som hemmer midazolams metabolisme mer enn den positive kontrollen vil få en høyere hemmingprosent.

Råekstraktene 96E-Rå og 50E-Rå og fraksjonene 50E-Amb, 50E-Met og 50E-Gel hemmet dannelsen av metabolittene 1-OH- og 4-OH-midazolam med henholdsvis ≥ 87 % og ≥ 90 %, noe som kan tyde på at bare ≤ 13 % og ≤ 10 % av midazolam i disse råekstraktene og fraksjonene ble metabolisert til 1-OH- og 4-OH-midazolam. 50E-Rå viste størst hemming av alle, ettersom ingen topper av metabolitter ble detektert i MS-spekteret. Dette tyder på at 50E-Rå hemmet metabolismen av midazolam tilnærmet 100 %. Råekstraktet 100V-Rå hemmet dannelsen av 1-OH-midazolam (59 %) og 4-OH-midazolam (65 %), mens 50V-Rå og fraksjonene 50V-Gel og 100V-Gel hemmet dannelsen av 1-OH- og 4-OH-midazolam med henholdsvis ≤ 25 % og ≤ 43 %.

Det ble vist at råekstraktene hemmet sterkere enn de tilsvarende fraksjonene etter gelfiltrering. Dette kan ha noe med at råekstraktene har mer fargestoffer, noe som indikerer at de kan inneholde mer fenoliske substanser enn fraksjonene etter gelfiltrering. Det ser ut som om at hemmingen avtar som en følge av opprensing av fraksjonene. Dette ses ved at råekstraktet 50E-Rå hemmet sterkere enn 50E-Amb, som igjen hemmet mer enn 50V-Gel. Grunnen kan være at de lavmolekylære substansene, som ble rensset bort med absorpsjonskromatografi og gelfiltrering, kan være stoffene som var ansvarlige for hemmingen. Det ble også vist at 50E-Met hemmet i større grad enn 50E-Amb. Begge er fraksjoner etter absorpsjonskromatografi. 50E-Met er et metanoleluat og vil antakeligen innholde mer lavmolekylære substanser enn 50E-Amb som er vanneluat. Det tyder dermed på at de lavmolekylære substansene er ansvarlige for den hemmede effekten. Det ble vist at midazolam i alle prøvene (unntatt 50E-Rå) metaboliserte mer til 1-OH- enn 4-OH-midazolam. I tillegg ble det også observert at toppen til diazepam i LC/MS-kromatogrammet var noenlunde lik i alle prøvene og kontrollen. Dette er i tråd med tidligere studier (Postvoll, 2006), og viser at forsøket var utført tilfredsstillende og resultatene ikke var tilfeldige. Likevel må det utføres flere ganger for å kunne bekrefte at svartsubstrat hemmer aktiviteten til enzymet CYP-3A4.

6.3.4 DPPH radikal scavenger aktivitet test



Figur 6.12: %-vis DPPH scavenging for de ulike fraksjonene fra svartsurbær. IC₅₀-verdier vises til høyre.

Mange fenoliske substanser, både syntetiske og naturlige har vist antioksidant- og radikal scavenger aktivitet (Malterud et al., 1993). Svartsurbær har et høyt innhold av fenoliske substanser og er dermed forventet å ha DPPH radikal scavenger aktivitet. Råekstraktene 96E-Rå og 50E-Rå, fraksjonene etter absorpsjonskromatografi og 50E-Gel ble testet for DPPH radikal scavenger aktiviteten. Disse ble valgt fordi de er antatt for å inneholde varierende grad av fenoliske substanser. Aktivitetene til disse fraksjonene er vist som ICH₅₀-verdier (figur 6.12). Verdien står for den laveste konsentrasjonen av prøven som må til for å gi en reduksjon på 50 % av DPPH-aktivitet.

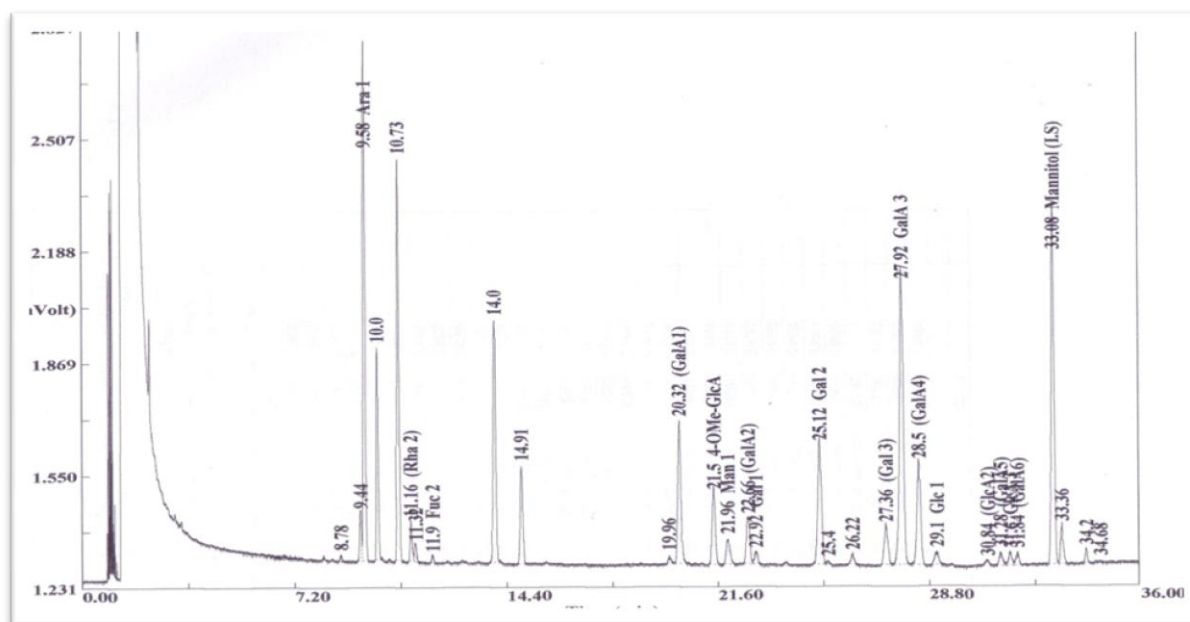
Det ble observert størst aktivitet i 50E-Met og 50E-Rå. De har en ICH₅₀-verdi på henholdsvis 12,5 og 17,7 µg/ml. Resultatene var noenlunde som forventet, ettersom disse kan være blant de fraksjonene som inneholder mest fenoliske substanser. 96E-Rå har ICH₅₀-verdi på 106 µg/ml, og har dermed lavere aktivitet enn 50E-Met og 50E-Rå. Dette kan skyldes at ekstraktet inneholder andre typer fenoliske substanser og/eller et større innhold av andre forbindelser som salter. ICH₅₀-verdiene til 50E-Amb og 50E-Gel er større enn 167 µg/ml. Disse fraksjonene har derfor relativt dårlig aktivitet. Begge fraksjonene var rensset, 50E-Amb med absorpsjonskromatografi, mens 50E-Gel ble rensset med gelfiltrering i tillegg. Det antas at mye av de fenoliske substansene ble rensset bort, og det er dermed forventet at de hadde lavere aktivitet enn andre fraksjoner. Det er litt uventet at 50E-Gel hadde høyere aktivitet enn 50E-Amb. En ulempe med metoden er at DPPH er nokså forskjellig fra fysiologiske radikaler. Det er imidlertid vist at resultatene fra DPPH-scavenging er godt korrelert med andre fysiologisk relevante essays som peroksidering av respirerende hepatocytter med t-butyl hydroperoksid (Malterud et al., 1993).

6.4 Kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av karbohydrat

6.4.1 Monosakkaridbestemmelse

Karbohydratinnhold og monosakkaridsammensetning i alle frysetørkede fraksjoner kan bestemmes ved metanolyse, etterfulgt av TMS-derivatering og GC-FID analyse. Det er vanlig at disse monosakkaridene: arabinose (Ara), rhamnose (Ara), galaktose (Gal), galakturonsyre (GalA), fucose (Fuc), xylose (Xyl), mannose (Man), glukose (Glc), glukuronsyre (GlcA) og 4-O-metyl-glukuronsyre (4-O-Me-GlcA) inngår i plantepolysakkarider. Et eksempel GC-kromatogram er vist på figur 6.13.

Etter at polysakkarider i prøvene er blitt metanolysert, vil hvert monosakkarid foreligge i flere konformasjoner. Grunnen til dette er at monosakkarider kan opptre på to anomere former (α og β), i tillegg til at de kan foreligge i pyranoseform, furanoseform eller i åpen kjedeform. Alle monosakkarider har et karakteristisk mønster av topper ved visse retensjonstider i GC-kromatogrammet. Ved å sammenligne kromatogrammet med standarder, kan monosakkaridene i metanolyseprøven identifiseres. Arealet under hver topp i kromatogrammet brukes til å bestemme mengde av de ulike monosakkaridene. Mannitol ble tilsatt som intern standard i kjent mengde, og gjør det mulig å kunne bestemme monosakkaridinnholdet kvantitativt. Mannitol kompenseres også for eventuelle tap og variasjoner i systemet og utførelsen av testen.



Figur 6.13: Et eksempel på et kromatogram fra GC-en. Monosakkarider kan identifiseres ved hjelp av standarder. Arealet under en topp tilsvarer mengde av et bestemt monosakkarid som finnes i prøven.

Råekstrakter (tabell 6.8)

Vannektraktene 50V-Rå (62,0 %) og 100V-Rå (100,0 %) har høyere karbohydratinnhold enn etanolekstraktene 96E-Rå (37,5 %) og 50E-Rå (34,9 %). Lavt karbohydratinnhold i 96E-Rå og 50E-Rå kan tyde på at de også inneholder andre forbindelser. På grunn av ekstraktens farge er det grunn til å tro at de inneholder fenoliske forbindelser. Resultatene er forventet ettersom polysakkarider er generell bedre løst i vann enn i etanol. Det kan også tenkes at mye av lavmolekylære substanser i residuet har blitt ekstrahert ut før ekstraksjon med vann, noe som også kan føre til at vannfraksjonene får et ”renere” innhold av polysakkarid.

96E-Rå inneholder mye Glc (93,9 %), som kan komme fra lav molekylære substanser, cellulose i plantecelleveggen og stivelse. Ekstraktet har i tillegg spormengde av Ara og litt Gal og GalA, men ikke Rha.

50E-Rå, 50V-Rå og 100V-Rå har relativ lik monosakkaridsammensetning, der Ara, Gal og GalA utgjør mesteparten av karbohydratinnholdet. Rha er også tilstede, men i mindre andel. Funnet av disse monosakkaridene kan tyde på pektintype polysakkarider. Det er identifisert høyere andel av 4-O-Me-GlcA i 50E-Rå enn i 50V-Rå og 100V-Rå. Dette monosakkaridet er ikke vanlig å finne i plantepolysakkarid, men har blitt funnet i enkelte planter. Det er ikke detektert GlcA i noen av ekstraktene, men spormengde av Fuc er funnet i 100V-Rå.

Fraksjoner fra absorpsjonskromatografi (tabell 6.8)

Karbohydratinnholdet er 32,5 % og 22,2 % for henholdsvis 50E-50E-Amb og 50E-Met. Resultatene er forventet fordi 50E-Amb er et vanneluat og vil antakelige innholde mer polysakkarider enn 50E-Met som er metanoleluat (metode 5.3.1). Karbohydratinnholdet i disse fraksjonene er lave samtidig som de er fargede. Dette kan tyde på at de også inneholder andre forbindelser, mest sannsynlig fenoliske forbindelser på grunn av fargen. Funnet av Ara, Gal og GalA er høye i begge fraksjonene. Dette kan tyde på at de inneholder pektintype polysakkarider. Andelen av 4-O-Me-GlcA i 50E-Met er 37,3 % og i 50E-Amb 21,8 %, noe som er relativt høyt sammenlignet med andre fraksjoner.

Fraksjon	Ara	Rha	Fuc	Xyl	Man	4-O-Me-GlcA	Gal	GalA	Glc	GlcA	Karbohydratinnhold (%)
96E-Rå	0,7	-	-	-	-	-	3,1	2,3	93,9	-	37,5
50E-Rå	19,4	3,7	-	3,5	2,4	18,1	19,6	28,2	5,3	-	34,9
50V-Rå	22,7	5,9	-	9,0	2,7	2,6	12,1	41,1	3,9	-	62,0
100V-Rå	30,3	5,6	0,3	5,3	5,3	2,6	15,0	29,5	5,9	-	100,0
50E-Met	30,2	2,1	-	-	-	37,3	11,4	7,6	11,4	-	22,2
50E-Amb	12,5	3,6	-	3,9	-	21,8	18,6	33,1	5,4	1,1	32,5
50E-Gel	14,8	4,4	-	4,9	2,0	5,8	16,9	48,2	2,0	1,1	100,0
50V-Gel	23,6	7,1	-	8,0	2,8	2,0	12,4	41,4	2,7	-	56,5
100V-Gel	37,2	6,5	0,3	5,7	5,6	1,0	16,7	21,5	5,5	-	100,0
50E-N	27,9	4,9	-	7,8	10,6	4,6	30,1	7,0	7,1	-	20,0
50E-S1	19,7	-	-	-	23,9	-	33,2	6,7	16,5	-	9,6
50E-S2	18,3	1,3	-	3,3	10,8	-	28,5	29,8	8,1	-	86,6
50E-S3	7,1	2,5	-	1,3	1,2	-	10,0	73,6	1,7	2,7	100,0
50E-S4	7,4	5,0	0,4	10,9	-	-	6,0	63,0	1,3	6,1	91,7
50V-N	41,7	10,0	-	11,8	5,0	5,0	20,9	-	4,6	0,6	79,4
50V-S1	11,4	1,8	0,2	31,4	13,2	4,0	10,8	11,4	9,5	6,2	100,0
50V-S2	16,9	5,0	-	1,8	-	-	5,8	69,6	0,9	-	100,0
50V-S3	14,7	8,0	-	9,2	-	6,6	5,5	55,1	0,9	-	87,4
100V-N	47,1	4,5	spor	2,8	6,6	-	20,6	8,3	10,1	-	72,0
100V-S1	29,0	7,2	1,0	8,9	2,5	-	25,8	19,3	6,3	-	97,1
100V-S2	6,8	2,7	0,7	8,3	28,3	0,4	16,1	6,1	23,6	7,0	100,0
100V-S3	25,8	8,5	0,3	4,7	0,7	-	15,0	42,3	2,0	0,7	100,0
100V-S4	17,8	9,8	0,3	10,5	1,8	8,1	8,6	38,3	1,0	3,8	100,0

Tabell 6.8: Prosentvis av forskjellige monosakkarider i forhold til den totale mengden av karbohydrater i ulike fraksjoner etter metanolyseanalyse. Karbohydratinnholdet, målt i prosent er også vist.

Fraksjoner fra gelfiltrering (tabell 6.8)

50E-Gel og 100V-Gel ser ut til å inneholde rundt 100 % karbohydrat, men 50V-Gel er ca. 56,5 %. De er fraksjonene etter gelfiltreringen (metode 5.3.2), og vil fortrinnsvis bestå av høymolekylære forbindelser som polysakkarider. Resultatene stemmer noenlunde for 50E-Gel og 100V-Gel da de har høyt karbohydratinnehold. Men det stemmer dårlig for 50V-Gel, da den har lavere karbohydratinnehold enn 50V-Rå. Dette kan skyldes unøyaktighet ved innveining av prøven.

Høy andel av GalA i alle fraksjoner kan tyde på tilstedeværelse av HGA. Forekomst av Rha i tillegg til GalA kan være tegn på RG-I i disse fraksjonene. Det er detektert høye andeler av Ara og Gal, noe som kan tyde på at fraksjonene har AG-I eller AG-II. Relativt liten mengde av Glc er detektert i alle fraksjoner. Glc er ikke typisk å finne i pektintype polysakkarider, men polysakkaridfraksjoner kan inneholde Glc fra andre polymer som xyloglukan eller stivelse osv. Små mengde Glc i fraksjonene kan komme fra ulike forurensningskilder som fra glassutstyr som ikke er tiltrekkelig vasket. Ettersom det er funnet Man og Xyl i alle fraksjoner i tillegg til Glc, kan det tyde på glukomananer og/eller xyloglukaner. Det er funnet 4-O-Me-GlcA i alle fraksjoner, men spormengde av Fuc og GlcA er bare detektert i henholdsvis i 100V-Gel og 50E-Gel.

Fraksjoner fra ionebytterkromatografi (tabell 6.8)

Resultatene viser at de fleste fraksjonene har et karbohydratinnehold på 72 % eller større. Det er funnet høyere karbohydratinnehold i sure fraksjoner enn i nøytrale. Med unntak av 50V-N og 50E-S1 inneholder alle fraksjoner Ara, Gal, GalA og Rha, som trolig er kommet fra pektintype polysakkarider. Noen av disse fraksjonene har også relativt mye Ara og Gal, som kan være på grunn av mange forgreininger i pektinet og/eller lange sidekjeder med AG I-II. Relativ høy andelen av Ara i disse fraksjonene kan også tyde på arabinaner, men forekomst av GalA i tillegg til Rha er et tegn for tilstedeværelsen av RG-I.

Fraksjonene 50E-S1 og 50E-S2 har mye Glc i tillegg til Man, disse monosakkaridene er ikke vanlig å finne i pektintype polysakkarider. Tilstedeværelse av Glc og Man kan skyldes stivelse, mannaner og/eller glukomananer. 50E-S4 inneholder Xyl og GalA med en andel på henholdsvis 10,9 % og 63,0 %, noe som kan tyde på innhold av xylogalakuronaner (XG). Denne strukturen er f. eks funnet rikelig i soya bønner (Schols & Voragen, 2002).

Det er uventet at 50E-N (20,0 %) og 50E-S1 (9,6 %) har lite karbohydrat. Årsaken kan være underestimering av karbohydratinnhold fordi polysakkaridene i prøvene er ufullstendig metanolysert og/eller destruksjon av monosakkarider i disse prøvene. Rester av vann i prøvene kan forstyrre dannelsen av metylglykosider i metanolysetrinnet, slik at det kan resultere i lavere karbohydratinnhold i disse fraksjonene. Resultatene fra disse to fraksjonene er dermed usikre.

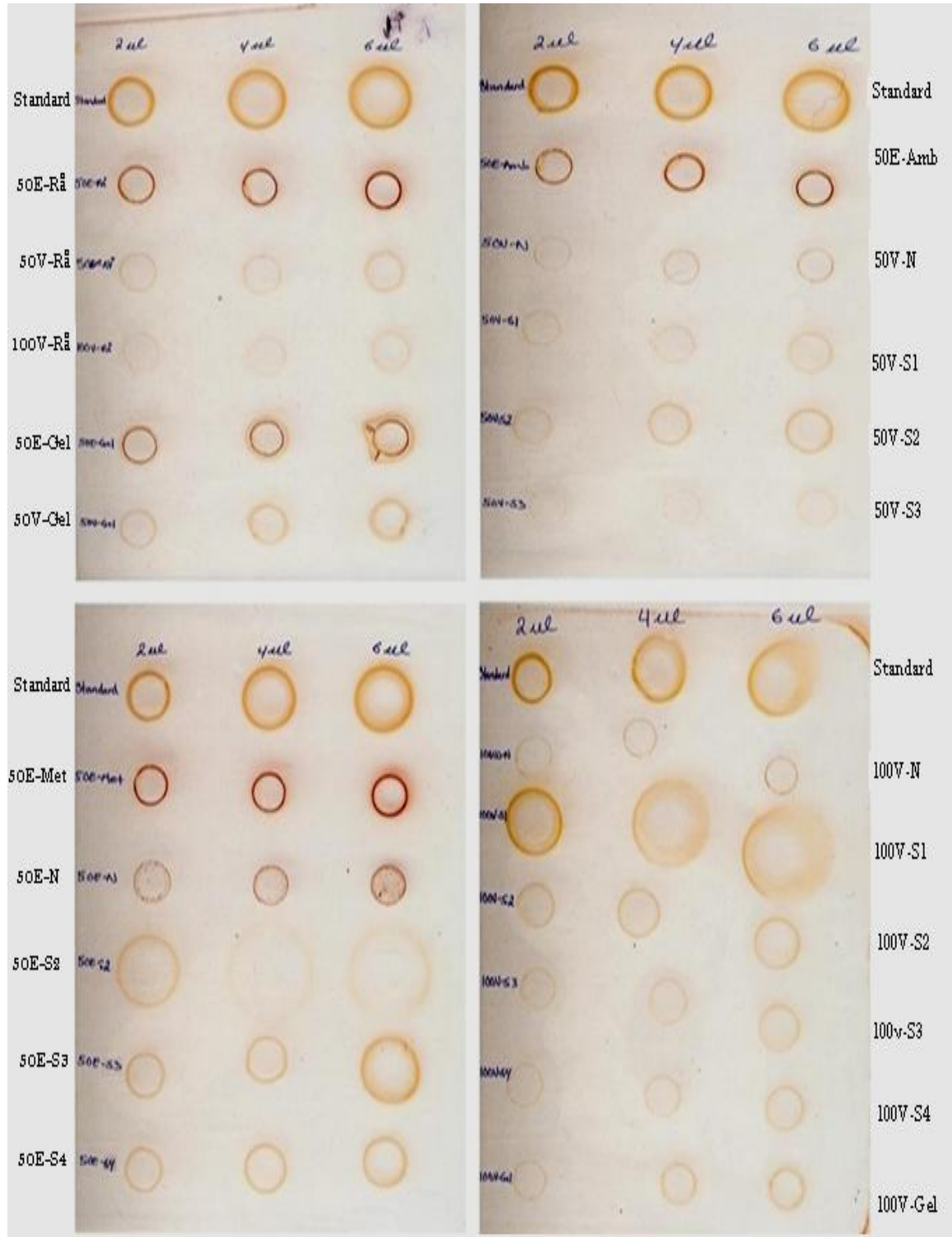
Relativt høyt innhold av Xyl er ikke vanlig i pektintype polysakkarider, men har blitt observert i enkelte planter, de kan stamme fra xylaner, xyloglukaner eller muligens xylogalakturonaner. Det er mest sannsynlig at 50V-S1 har et xylan med hovedkjede bestående av Xyl enheter, fordi fraksjonen har en høy andel av Xyl (31,4 %). Fraksjonen kan også inneholde xyloglukaner og xylogalakturonaner, da det i tillegg er detektert Glc (9,5 %) og GalA (11,4 %). Andelen av GalA (69,6 %) i 50V-S2 er meget høy sammenlignet med andre monosakkarider som er tilstede. Det er dermed grunn til å tro at HGA som bestående av GalA enheter er å finne i denne fraksjonen. 50V-S3 inneholder GalA (55,1 %), som sammen med Xyl (9,2 %) kan det tyde på XG.

Andelen av GalA er 19,3 % og 38,8 % for henholdsvis 100V-S1 og 100V-S4. Til disse fraksjonene er også Xyl funnet i tillegg, noe som kan tyde på XG. 100V-S2 har både Man (28,3 %) og Glc (23,6 %), som kan tyde på glukomananer. Fuc er tilstedet i alle 100 °C vannfraksjoner, men bare i relativ små mengder. Det er også funnet GlcA i 100V-S2, 100V-S3 og 100V-S4, men i varierende andel. Fraksjonen 100V-S4 har en andel av 4-O-Me-GlcA på 8,1 %. Det er også funnet spormengder av dette monosakkarid i 100V-S2.

Teoretisk skal ikke nøytrale fraksjoner inneholde GlcA og GalA (5.3.4). Det er dermed uventet at 100V-N og 50E-N inneholder henholdsvis 8,3 % og 7,0 % av GalA. Årsaken til dette kan være at kolonnen er overbelastet, slik at en del sure polysakkarider ikke binder til kolonnematerialet. Denne årsaken er utelukket i 50E-N, da fraksjonen har så lavt karbohydratinnhold. En annen årsak som kan være, er at både 50V-N og 100V-N inneholder en del metoksylerede pektintype polysakkarider, som ikke har affinitet til kolonnematerialet, fordi GlA enheter i disse polysakkaridene er forestret med metanol.

6.5 Strukturoppklaring

6.5.1 Identifikasjon av AG-II med Yariv reagens test



Figur 6.14: Prøver som inneholder AG-II vil felle ut med Yariv reagenset. Positivt utsalg vises i form av en rød ring rundt brønnene.

Resultatene fra metanolysen (6.4.1) viser at mange fraksjoner inneholder monosakkaridene Ara og Gal, noe som kan tyde på tilstedeværelse av arabinogalaktaner. Det er beskrevet at den komplementfikserende aktiviteten som arabinogalaktaner har ofte er relatert til AG-II (Yamada & Kiyohara, 2007). Det er dermed ønskelig å utføre Yariv reagens test for å identifisere eventuelle AG-II i disse fraksjonene. Yariv-reagenset brukes til å identifisere AG-II fordi det bindes spesifikt til AG-II, ikke til andre type arabinogalaktaner. Hvis de undersøkte fraksjonene inneholder AG-II, vil en rød ring vises rundt brønnene der prøvene er påsatt. Dette er utfellingen av et rødt kompleks som er dannet mellom Yariv-reagenset og AG-II (metode 5.6.1).

Med unntak av 96E-Rå og 50E-S1, ble alle fraksjonene undersøkt for innhold av AG-II.

Det ble observert en rød ring rundt mange brønner (figur 6.14), noe som tyder på at de fleste fraksjonene kan inneholde AG-II. 100V-S1, 50E-S2 og 50E-S3 har større ringstørrelse og høyere fargeintensitet enn andre fraksjoner, likevel kan ikke det konkluderes med at disse fraksjonene inneholder mer av AG-II enn andre fraksjoner. Grunnen til dette er at fargeintensiteten til ringene kan forstyrres av prøvenes egne farger, mens størrelsen til ringene kan være avhengig av prøvenes viskositet og evne til å diffundere i gelen. I tillegg kan tilstedeværelse av forstyrrende stoffer eller struktur i nærheten av AG-II påvirke bindingsevne til AG-II, slik at ringen vises utydelig. Dette gjør at fargeintensitet og ringstørrelse rundt brønnene ikke kan brukes til kvantitativ bestemmelse av AG-II.

50E-Rå, 50E-Amb og 50E-Met er opprinnelig rødfarget. Det er dermed usikkert om den røde ringen som oppstod var et positivt utslag for testen eller stammet fra fraksjonenes farge. Ettersom ringstørrelsene til disse fraksjonene var like store som brønnenes diameter er det grunn til å tro at de ikke har innhold av AG-II. Noen fraksjoner ga også utydelige utslag slik at det er vanskelig å tyde tilstedeværelse av AG-II. Fraksjonene 50E-N, 50V-Rå, 50V-N, 100V-Rå og 100V-N ga negativt utslag for testen, noe som kan tyde på at de ikke inneholder AG-II.

Arabisk gummi ble brukt som standard, og den ga tydelig positivt utslag. Ringstørrelsen var doseavhengig i alle fire plater. I brønnene som ble applisert med 6 µl var ringstørrelse større enn i de som var applisert med 4 µl og 2 µl. Dette viser at testen er utført tilfredsstillende.

6.5.2 Bindingsbestemmelse

For å bestemme bindingsmønster mellom monosakkaridene ble polysakkaridene karboksylsyreredusert, metylert, hydrolysert, acetylt og deretter analysert på GC/MS. Informasjonen om bindingsmønster er nødvendig for kunne si noe om hvilke type polysakkarider som finnes i forskjellige fraksjoner. Disse fraksjonene: 100V-N, 100V-S1, 100V-S2, 100V-S3, 100V-S4 og 50E-Amb ble valgt til å analysere for bindingsmønster. Fordi det er ønsket å sammenligne fraksjoner fra samme utgangsmaterialet, og på den måten kan man si noe om strukturer kan relatere til biologiske aktivitet.

Et hvert monosakkarid med en gitt bindingstype som analyseres på GC/MS, gir opphav til en topp med et karakterisk massespekter. Ved å sammenligne toppenes retensjonstider og massespektrer med kjente standarder, kan monosakkarider og deres bindingstyper identifiseres. Fordelingen av de ulike bindingene kan anslås på grunnlag av areal under toppene i GC/MS-kromatogrammet og masseforholdene til fragmentene i MS-spektrene. Resultatene fra analysen ble så justert med metanolysesresultatene. En fordelingsoversikt av monosakkarider og deres bindingstyper i den enkelte fraksjonen er vist i tabell 6.9. Det finnes dessverre ikke standarder for alle bindingstypene. Det antas derfor at alle bindinger gir lik utslag i MS-detektoren, noe som antakelig ikke er riktig. I tillegg er det vanskelig å integrere alle topper optimale, så kvantifisering av monosakkarider og deres bindingstyper har en viss unøyaktighet. Samtidig kan metanolysesresultatene være noe unøyaktige. Dette gjør at man ikke er stand til å angi den eksakte polysakkaridstrukturen, men bare hovedtrekk av strukturen kan foreslås.

Terminal Glc og GlcA/4-O-Me-GlcA er henholdsvis nøytralt og surt monosakkarid, de har ulik molekylstruktur, men vises i samme topp i GC/MS-kromatogrammet. For å kunne skille disse to, ble GlcA/4-O-Me-GlcA aktivert med carbodiimid, så redusert med NaBD₄. Det dannes 6,6-dideuteriosukre, som lar seg skille fra nøytrale monosakkarider ved GC/MS-analyse. Fordi de har fragmenter med molekylvekt M+2 i MS-spekteret. Mengdefordeling mellom Glc og GlcA/4-O-Me-GlcA kan estimere ved å se på intensiteten mellom fragmenter 45 og 47. Dette prinsippet kan brukes, dersom man også ønsker å skille: mellom Gal og GalA, mellom 1,4-Glc og 1,4-GlcA, og mellom 1,4-Gal og 1,4-GalA. Ulempen med denne metoden er at man ikke kan skille mellom terminal GlcA og terminal 4-O-Me-GlcA, fordi begge har lik retensjonstid og massespektrer. Metanolysesresultatene viste imidlertid at noen prøver inneholder 4-O-Me-GlcA, men ikke GlcA, så avlest terminal GlcA må derfor være terminal 4-O-Me-GlcA.

Monosakkarider	Bindingstype	50E-Amb	100V-N	100V-S1	100V-2	100V-3	100V-4
Arabinose	Tf	5,8	1,8	9,6	2,7	5,9	3,0
	1,3	0,9	2,3	1,2	0,4	1,0	0,5
	1,5	5,1	32,2	14,4	2,8	15,2	9,0
	1,3,5	0,7	10,2	3,7	0,9	3,4	1,6
	1,2,5	-	0,6	0,1	-	0,3	3,7
Rhamnose	Tp	0,8	1,5	0,6	2,0	0,9	0,4
	1,2	2,8	1,9	5,2	-	5,5	8,5
	1,2,4	-	1,1	1,4	0,7	2,1	0,9
Fucose	Tp	-	spor	1,0	0,7	-	-
Xylose	Tp	3,9	2,8	8,9	2,2	4,7	10,5
	1,4	-	-	-	6,1	-	-
Mannose	Tp	-	-	-	3,5	-	-
	1,4,6	-	-	-	24,8	-	-
	1,4	-	6,6	-	-	-	-
Galaktose	Tp	3,4	3,2	5,7	2,8	2,0	0,9
	1,4	11,9	16,6	17,6	9,3	11,8	7,4
	1,6	1,7	0,1	0,6	3,9	0,2	-
	1,3	1,6	0,7	1,6	-	0,8	0,3
	1,3,6	-	-	0,3	0,1	0,2	-
Galakturonsyre	Tp	10,3	spor	spor	spor	1,3	0,6
	1,4	22,8	8,3	19,3	6,1	41,0	37,7
Glukose	Tp	0,2	1,5	0,6	0,2	0,2	1,0
	1,4	5,2	6,3	3,3	21,0	1,8	-
	1,6	-	-	-	-	-	-
	1,4,6	-	2,3	2,4	2,4	-	-
Glukukonsyre	Tp	Spor	spor	-	7,0	-	spor
	1,4	1,1	-	-	-	-	-
4-O-Me-GlcA (terminal)		21,8	-	-	spor	-	8,1
%vis av terminal monosakkarid		46,2	10,8	17,5	15,4	15,0	24,6

Tabell 6.9: Prosentvist innhold av bindingstyper fra ulike monosakkarider. Beregningen er basert på areal under toppene og massespektrer fra GC/MS-analyse. Tp = terminalpyranose og Tf = terminalfuranose.

Terminale monosakkarider (tabell 6.9)

Resultatene i tabell 6.9 viser at alle seks fraksjoner har terminale monosakkarider. Det er størst andel av terminale enhetene i 50E-Amb (46,2 %) og minst i 100V-N (10,8 %). Alle fraksjonene har terminale enhetene av Ara, Rha, Xyl, Gal og Glc, men i varierende andel. Andelene av terminale 4-O-Me-GlcA (21,8 %) og GalA (10,3 %) er størst i 50E-Amb, sammenlignes med andre fraksjoner. 100V-S1 og 100V-S4 har stor andel av terminal Xyl, med henholdsvis 8,9 % og 10,5 %. 100V-S2 har mye mer terminal GlcA (7,0 %) enn andre fraksjoner. Jo større andel av terminale monosakkarider et pektin har, jo mer vil pektinet være forgrenet. Det kan dermed tenkes at eventuelle pektiner i 50E-Amb kan ha høy grad av forgreiningen. Men mulige pektiner i de andre fraksjonene vil være mindre forgrenet, fordi fraksjonene har lavere andelen av terminale monosakkaridene.

Homogalakturonan (HGA) (tabell 6.9)

Alle fraksjoner inneholder 1,4-galA. Det er mye 1,4-galA i 100V-S3 (41 %), 100V-S4 (37,7 %), 50E-Amb (22,8 %) og 100V-S1 (19,3 %), og lite i 100V-N (8,3 %) og 100V-S2 (6,1 %). Dette kan tyde på at fraksjonene inneholder HGA, men i varierende mengde.

Rhamnogalakturonan I (RG-I) (tabell 6.9)

Alle fraksjoner har 1,4-GalA i tillegg til 1,2-Rha (unntatt 100V-S2) og 1,2,4-Rha (unntatt 50E-Amb). Typiske bindinger i RG-I er 1,4-galA og 1,2-Rha. Rha enhetene har ofte forgreiningspunkter på C-4 eller C-3, og RG-I kan dermed også inneholde 1,2,4- og 1,2,3-Rha. Forekomst av disse komponentene indikerer at fraksjonene kan inneholde RG-I. Det er ikke detektert 1,2,4-rha i 50E-Amb, likevel kan man ikke utelukke at fraksjonen inneholde RG-I, derimot kan den inneholde uforgrenet RG-I. Det er ikke funnet 1,2-rha i 100V-S2, men 0,7 % forgrenede 1,2,4-rha er detektert. Dette kan tyde på tilstedeværelse av RG-I i fraksjonen er lite, men at alle Rha enhetene i RG-I er forgrenet.

Rhamnogalakturonan II (RG-II) (tabell 6.9)

RG-II har hovedkjede bestående av 9-10 1,4-galA enheter, med fire forskjellige "sjeldne" oligosakkarider festet til C-3 eller C-4. Det er funnet 1,4- galA i alle fraksjonene, men 1,3,4-galA med C-3 som forgreningspunkt er ikke detektert. Det er ikke forsøkt å påvise "sjeldne" oligosakkaridene som er kjennetegn for RG-II. På grunnlag av 1,3,4-galA ikke er tilstede, kan det likevel anta at fraksjonene inneholder ingen eller inneholder lite RG-II.

Arabinogalaktan I (AG-I) (tabell 6.9)

Typiske bindinger i AG-I er 1,4-gal i tillegg til terminal- og 1,5- ara. Alle fraksjoner har 1,4-gal, noe som tyder på at de kan innholde AG-I. Forekomst av 1,4-gal er varierende i alle fraksjoner, noe som tyder på at AG-I er også tilstede i forskjellige mengde i disse fraksjonene. Deteksjon av terminal- og 1,5-ara i disse fraksjonene støtter funnet av AG-I. Tilstedeværelse terminal- og 1,5-ara er høy for henholdsvis 100V-S1 (9,6 %) og 100V-N (32,2 %) sammenlignet med andre fraksjoner. 1,4-gal er også høyst i 100V-N og 100V-S1. Det er litt uventet at det ikke funnet noen 1,3,4-gal med C-3 som forgreningspunkt.

Arabinogalaktan (AG-II) (tabell 6.9)

AG-II har typiske bindinger som 1,3- og 1,6-gal, i tillegg til terminal- og 1,3-ara. I hovedkjede med 1,3-gal enhetene finnes det forgreningspunkt på C-6 og AG-II har dermed også forgrenede 1,3,6-gal. Det er funnet små mengde av 1,6-gal (unntatt 100V-S4) og 1,3-gal (unntatt 100V-S2) i alle fraksjoner, noe som kan tyde på innhold av AG-II. Påstanden om AG-IIs innhold er styrket for 100V-S1, da den ga positivt utslag i Yariv reagens test (6.5.1), men svekket for andre fraksjoner, da de enten ga svakt eller ingen utslag. Fordi det ikke er funnet 1,3-gal i 100V-S2, kan det tenkes at AG-IIs hovedkjede i denne fraksjonen bare består av 1,6-gal. Det er mest sannsynlig at 100V-S4 har AG-IIs hovedkjede bestående av bare 1,3-gal, da det ikke er funnet 1,6-gal, Det er funnet lite 1,3,6-gal i 100V-S1, 100V-S2 og 100V-S3, noe som kan tyde på at fraksjonene ikke er forgrenet i stor grad. Både terminal- og 1,3-ara er detektert i alle fraksjoner, noe som støtter på at disse fraksjonene kan innholde AG-II. Fordi 1,3-, 1,3,6- og 1,6-gal er bare funnet i små mengde, kan det tydes på at disse fraksjonene har lite AG-II. Det er uventet at andel av Ara er større enn Gal, fordi oftest så har AG-II mer av Gal enn Ara.

Arabinaner (tabell 6.9)

Typiske bindinger i arabinaner er 1,5-ara og 1,3,5- eller 1,2,5-ara med forgreningspunkter på C-3 eller C-2. Til forgreningspunktene er det 1-3 arabinoseenheter som festet på. Det er påvist 1,5-ara i alle fraksjoner, noe som kan tyde på at de innholder arabinaner. Det er mye 1,5-ara i 100V-N (32,2 %), 100V-S1 (14,4 %) og 100V-S3 (15,2 %), det betyr da at de innholder mest arabinaner. Det er funnet 1,3,5-ara i alle fraksjoner med størst andel i 100V-N (10,2 %). Med unntak av 50E-Amb og 100V-S2 er det funnet 1,2,3-ara i alle fraksjoner. Dette styrker teorien om at fraksjonene innholder arabinaner.

Xylogalakturonan (XGA) (tabell 6.9)

Når xylose-enheter binder seg til C-3 på homogalakturonan, kalles man denne strukturen for XGA. Typiske bindinger for XGA er 1,3,4-galA og terminal-xyl. Det er funnet terminal-xyl i alle fraksjoner med størst andel i 100V-S4 (10,5 %) og 100V-S1 (8,9 %), men 1,3,4-galA ikke er detektert i noen av fraksjonene. Likevel kan det tenkes at noe terminal-xyl i disse fraksjonene, særlig 100V-S4 og 10V-S1 kan være bundet som XGA, men at metoden ikke klarte å detektere 1,3,4-galA. Det er påvist 1,4-xyl (6,1 %) i 100V-S2, noe som kan tyde på forekomsten av xylaner.

Andre strukturer (tabell 6.9)

- Basert på resultatene fra metanolyse og metylering kan noen fraksjoner innholde andre strukturer enn pektintype polysakkarider. De kan innholde galaktomannaner, xyloglukaner og mannaner. Disse strukturene er funnet i cellevegg-polysakkaridene, og de kan dermed stamme fra frøene i svartsubærene (Buckeridge et al., 2000)
- **Mannaner**
Mannaner består av 1,4-man. Fordi det er funnet 1,4-man (6,6 %) i 100V-N kan det tyde på fraksjonen har mannaner.
- **Galaktomannaner**
Det er detektert 1,4,6-man (24,8 %) i 100V-S2. Denne enheten har forgreningspunkt på C-6. Det er også funnet galaktose i samme fraksjon, noe som kan tyde på at den inneholder galaktomannaner.
- **Xyloglukaner**
Xyloglukaner har hovedkjeden bestående av 1,4-glc forgrenet i C-6 med terminal-xyl. Siden det er funnet 1,4-glc i 100V-N (6,3 %), 100V-S1 (3,3 %) og 100V-S2 (21,0 %). Disse fraksjonene inneholder i tillegg 1,4,6-glc (2,3–2,4 %) og terminal-xyl. Dette kan tyde på de inneholder xyloglukaner.
- **Stivelse eller forurensinger fra cellulose**
Med unntak av 100V-S4 er det påvist terminal- og 1,4-glc i alle fraksjoner, noe som kan tyde på at disse fraksjonene kan innholde stivelse og/eller fra cellulose.
- **4-O-met-GlcA**
4-O-GlcA er funnet i 50E-Amb (21,8 %) og 100V-S4 (8,1 %). Den enheten er et terminalt monosakkarid. 4-O-met-GlcA bundet ofte på endingen av pektintype polysakkarider, men også andre polymerer i enkelte planter.

Oppsummering for 50E-Amb

Basert på bindingstyper som er detektert i kromatogrammet kan det tyde på innhold av HGA, uforgrenet RG-I, AG-I, arabinaner og 4-O-Me-GlcA, og muligens AG-II, og XGA. Det kan også forekomme stivelse og forurensning fra cellulose.

Oppsummering for 100V-N

Basert på bindingstyper som er detektert i kromatogrammet kan det tyde på at fraksjonen innehold HGA, RG-I (bare forgrenet), AG-I og arabinaner, og muligens mannaner AG-II, og XGA. Det kan også forekomme xyloglukaner, stivelse og forurensning fra cellulose.

Oppsummering for 100V-S1

Basert på bindingstyper som er detektert i kromatogrammet kan det tyde på at fraksjonen inneholde HGA, RG-I, AG-I og arabinaner, og muligens AG-II og XGA. Det kan også forekomme xyloglukaner, stivelse, forurensning fra cellulose.

Oppsummering for 100V-S2

Basert på bindingstyper som er detektert i kromatogrammet kan det tyde på at fraksjonen inneholde, HGA, RG-I, AG-I, arabinaner, galaktomanner og xylaner, og muligens AG-II, og XGA. Det kan også forekomme xyloglukaner, stivelse og forurensning fra cellulose.

Oppsummering for 100V-S3

Basert på bindingstyper som er detektert i kromatogrammet kan det tyde på at fraksjonen innholde HGA, RG-I, AG-I og arabinaner, og muligens AG-II og XGA. Det kan også forekomme av stivelse og forurensning fra cellulose

Oppsummering for 100V-S4

Basert på bindingstyper som er detektert i kromatogrammet kan det tyde på at fraksjonen innholde HGA, RG-I, AG-I, arabinaner og 4-O-Met-GlcA, og muligens XGA, AG-II.

6.5.3 Sammenheng mellom struktur og biologisk aktivitet

100V-S1, 50E-S2 og 50E-S3 ga størst utslag i Yariv reagens test, noe som kan tyde på innhold av AG-II. Blant disse tre var det bare 100V-S1 som hadde høy komplementfikserende aktivitet. 100V-N som er en tilsvarende fraksjon etter ionebytterkromatografi viste også høy aktivitet, men den ga ikke utslag i Yariv reagens test. Det samme gjelder for 50E-Amb, og ikke minst for 50E-Rå, 50E-Met og 100V-Rå som hadde en aktivitet større enn PMII. Disse ga heller ikke noe positivt utslag i testen. Basert på disse resultatene kan det tyde på det ikke er noe sammenheng mellom AG-II og komplementfikserende aktivitet.

Metyleringsresultatene viser at 50E-Amb, 100V-S(1-4) og 100V-N) kan inneholde HGA, RG-I, AG-I og arabinaner, og muligens AG-II og XGA. Andre utypiske pektintype strukturer kan i tillegg forekomme i noen fraksjoner. Ettersom alle seks fraksjonene har vist så like strukturer, blir det vanskelig å finne noen sammenheng mellom struktur og biologisk aktivitet. Ingen klare struktur-forskjeller ble funnet mellom disse fraksjonene. Kun en liten sammenheng mellom komplementfikserende aktivitet og innhold av AG-I og arabinaner ble funnet. Dette ses i 100VS-1 og 100V-N, da de viste høyest aktivitet, samtidig som de trolig hadde høyest innhold av arabinaner og AG-I blant disse seks fraksjonene. 50E-Amb som hadde en del aktivitet, ser ut som den også kan ha en del AG-I og arabinaner. Arabinaner med komplementfikserende aktivitet er blant annet funnet i frukten fra *Ziziphus jujuba* og i røttene til *Bupleurum falcatum*, men AG-I fra plantene *Glinus oppositifolius* og *Vernonia kotschyana* har også vist evne til å modulere komplementsystemet (Paulsen & Barsett, 2005).

Det ser også ut som om komplementfikserende aktivitet hos 100 °C vannfraksjoner etter ionebytterkromatografi minker etter surhetsgrad, da 100V-S1 viste høyest aktivitet, mens 100V-S4 viste lavest aktivitet. Som det har vært nevnt i forbindelse med metanolyse-resultatene (6.4.1) så inneholder 100V-N også GalA (8,3 %), dette kan tyde på at GalA er metylforestrert, eller at kolonnen kan ha vært overbelastet. Ved overbelastning kommer noe av gelekstraktet (100V-Gel) rett gjennom, og inneholder litt av alt.

7. Konklusjon

1. Ekstraksjon, opprensning og isolering av polysakkaridfraksjoner

Ekstraksjonen av bærmaterialet med 96 % etanol, 50 % etanol, 50 °C vann og 100 °C vann ga fire fraksjoner: 96E-Rå, 50E-Rå, 50V-Rå og 100V-Rå. Med unntak av 96E-Rå ble alle fraksjonene rensert og fraksjonert med absorpsjonskromatografi, gelfiltrering og ionebytterkromatografi. Dette ga totalt 23 fraksjoner (figur 2.1), de ble deretter analysert.

2. Biologisk aktivitet

50E-Met, 50E-Rå, 100V-S1 og 100V-N viste høyest komplementfikserende aktivitet blant alle fraksjoner. De har til og med høyere aktivitet enn PMII standarden. 100V-Rå og 100V-Gel hadde aktivitet tilsvarende PMII, mens aktiviteten til 50E-Amb var lavere. De andre fraksjonene viste betydelig lavere komplementfikserende aktivitet sammenlignet med PMII. Flere forsøk må til for å få et sikrere resultat ettersom testprosedyren er omfattende.

50E-Rå og 50E-Met var blant de fire fraksjonene som viste antimikrobiell effekt mot bakterien *S.aureus*. CYP hemmende effekt ble observert i alle ekstrakter og fraksjoner etter gelfiltrering og absorpsjonskromatografi. 50E-Rå og 50E-Met viste størst effekt av alle, hemmingen av metabolisme av midazolam var tilnærmet 100 % her, men 96E-Rå, 50E-Amb og 50E-Gel hemmet tilsvarende ≥ 87 %. Måling av DPPH scavenger aktivitet viste høy antioksidant effekt for 50E-Met og 50E-Rå. Begge hadde en ICH_{50} -verdi på henholdsvis 12,5 µg/ml og 17,7 µg/ml.

Basert på disse resultatene kan det tyde på at de observerte biologiske aktivitetene som svarturbær har vist, kan være relatert til de lavmolekylære fraksjonene. 50E-Rå er ekstraktet fra 50 % etanolekstraksjon, men 50E-Met er den tilsvarende fraksjonen etter adsorpsjonskromatografi. Begge fraksjonene har trolig stor variasjon av lavmolekylære substanser. På grunn av fraksjonenes farge er det grunn til å tro at de inneholder fenoliske substanser. Både 50E-Rå og 50E-Met har vist høyest aktivitet i alle testene. Disse lavmolekylære fraksjonene bør dermed analyseres nærmere for å finne eventuell sammenheng mellom aktivitet og struktur, ettersom flere studier har vist at effekter som svarturbær har, er ofte assosiert med fenoliske substanser.

3. Karbohydratinnhold og karbohydratsammensetning

Metanolysesresultatene viste at de fleste fraksjoner har et karbohydratinnhold på 80 % eller høyere. Andeler av galakturonsyre, galaktose, arabinose og rhamnose var høy i disse fraksjonene, noe som kan tyde på innhold av pektintype polysakkarider. Andre utypiske pektintype enheter som xylose, mannose, glukose og 4-O-Me-GlcA er også tilstede i noen av fraksjonene, men i mindre mengder.

4. Strukturoppklaring og biologisk aktivitet

Resultatene fra Yariv reagens test viste innhold av arabinogalaktan II i 100V-S1, 50E-S2 og 50E-S3. Blant disse var det kun 100V-S1 som hadde høy komplementfikserende aktivitet. Andre fraksjoner som hadde høyere aktivitet enn PMII ga ikke utslag i testen. Dette gjelder blant annet 50E-Met, 50E-Rå og 100V-Rå. Det kan dermed tyde på at det er ingen sammenheng mellom arabinogalaktan II og komplementfikserende aktivitet.

Bindingsinformasjonen fra metyleringsresultatene tyder på at 50E-Amb, 100V-N, 100V-S1, 100V-S2, 100V-S3 og 100V-S4 kan ha tilstedeværelse av pektintype polysakkarider. Det ser ut som om de kan inneholde homogalakturonan, rhamnosegalakturonan I, arabinogalaktan I, arabinaner, muligens forekomst av arabinogalaktan II og xylogalakturonan. Resultatene tilsier at polysakkaridstrukturene i disse fraksjonene er relative like. Ingen tydelige strukturforskjeller ble funnet mellom disse fraksjonene. Dette vil vanskeliggjøre tolkningen av sammenheng mellom biologisk aktivitet og struktur. En liten forskjell ble derimot funnet; 100VS-1 og 100V-N som hadde høyest komplementfikserende aktivitet, har også vist seg å ha høyest innhold av arabinaner og AG-I blant disse seks fraksjonene. Disse er fraksjonene etter både gelfiltrering og ionebytterkromatografi, de inneholder dermed mye høymolekylære forbindelser som polysakkarider.

8. Reagensliste

1-metylimidazole (Sigma)
Aceton (Chemiteknik)
Agarose (Bio-rad)
Amberlite XAD-7HP (Sigma)
Anx-sepharose 4 fast flow (Ge Healthcare Bio-sciences AS)
Bio-Gel P-6 Desalting gel (Bio-rad)
Carbodiimide (Sigma)
Dekstran (Pharmacia)
Diklormetan (Fluka)
DMSO (dimetylsulfoksid) (Merck)
Ediksyre i metanol (FI)
Eddiksyreanhydrid (Merck)
Etanol (FI)
Fenol (Merck)
Gelbond® film for agarosegel (Ge Healthcare)
Gum Arabica
HCl (saltsyre) i metanol (FI)
Heksametyl disilazan (Merck)
Imidazole i HCl (FI)
Isedikk (Prolabo)
Kloroform (Prolabo)
Konsentrert saltsyre (Prolabo)
MES (2[N-Morpholino]etan svovelsyre) (Sigma)
Mannitol i metanol (FI)
Metanol (Chemiteknik)
Metyljodid-løsning (Fluka)
NaBD₄ (natriumborodeuterid) (Aldrich)
Natriumazidløsning (NaN₃) (Merck)
NaOH (AnalaR)
NH₃-løsning (Merck)
Natriumazid (Merck)
Natriumklorid (Prolabo)

Natriumklorid (AnalaR)
Natriumtiosulfat-5-hydrat (Merck)
Oktanol (FI)
Pyridin (Merk)
Raffinose (Sigma)
Sephadex G-25 medium (GE-Healthcare)
Svovelsyre (Merck)
Sølvnitratløsning AGNO₃ (merk)
Toluenløsning (FI)
Trifloureddiksyre (Merck)
Trimetylklorsilan (Supelco)
TRIZMA (Tri[hydroksymetyl]aminometan) (Sigma)
Vannfri metanol (FI)
Yariv reagens løsning (Biosupplies)

9. Kildeliste

Aspinall, G.O. (1973).: Carbohydrate polymers of plant cell walls. Loewus, F. A (Ed) Biogenesis of cell wall polysaccharides. Academic Press, New York, 99.

Blois, M.S. (1958).: Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature 181: 1199–1200.

Bio-Rad Laboratories (2000).: Bio-Gel® P Polyacrylamid Gel. Instruction manu

Bogen, B. & Munthe, L.A. (2007).: Immunologi, utgave 2, Universitetsforlaget, 14–25, 136–142.

Brummer, Y. & Cui, S. W. (2005).: Understanding carbohydrate analysis. I Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications, Red.: Cui, S. W., CRC Press, Boca Raton, Fla., 70-72.

Buckeridge, M.S., Santos, H.P.D. & Tine, M.A.S. (2000).: Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. Plant Physiol Biochem 38, 141-156.

Chambers, R.E. & Clamp, J.R. (1971).: An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. Biochemical Journal 125 (4), 1009–1018

Cui, S. W. (2005).: Structural analysis of polysaccharides. I food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications, Red.: Cui, S. W., CRC Press, Boca Raton, Fla., 108-115.

GE Healthcare (2009).: PD-10 Desalting columns instructions.

http://www.gelifesciences.co.jp/tech_support/manual/pdf/chrdsalt/52130800.pdf sett
18.april 2009

GE Healthcare Bio-Sciences AB (2006). : Anx Sepharose 4 fast flow (high sub).
Instruction manual

Gasiorowski, K., Szyba, K., Brokes, B., Kolaczynska, B., Jankowiak-Wlodarczyk, M. & Oszmianski, J. (1997): Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. Elsevier Science Ireland Ltd. Cancer Letters 119, 37-46

Greibrokk, T., Lundanes, E. & Rasmussen, K.E.: (2005). Kromatografi: Separasjon og deteksjon. Pensumtjeneste A/S Oslo. 60-100

Hansen, M.H. (2000): Sårhelende planter i Mali. Screening av flere planter og videre studier av struktur og aktivitet i polysakkarider fra *Combretum glutinosum*. Universitetet i Oslo.

Hjemstad, R.(2007): Svartsurbær – *Aronia melanocarpa*.

http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/aron_mel.htm sett 13.juli.2008

Holst, G.J.V. & Clarke, A. (1985): Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. Analytical Biochemistry 148, 446-450.

Jurgonski, A., Juskiewicz, J. & Zdunczyk, Z.(2008): Ingestion of black chokeberry fruit extract leads to intestinal and systemic changes in a rat model of prediabetes and hyperlipidemia. Plant foods hum nutr 63, 176-182.

Kim, J-B. & Carpita, N.C. (1992): Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. Plant physiology 98, 646-653.

Laupsa-Borge, J.(2005): Aroniabær – indianerne effektive medisin. Mat og helse.32–37

Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. (2003): Brock Biology of Microorganisms. Prentice Hall, tenth edition, 704-705.

Malterud, K.E., Farbrot, T.L., Huse, A.E. & Sund, R.B.(1993):Antioxidant and radicalscavenging effects of anthraquinones and anthrones. Pharmacology, 47: 77-85.

Matsumoto, M., Hara, H., Chihi, H. & Kasai T.(2004).: Gastroprotective effect of red pigments in black chokeberry fruit (*Aronia melanocarpa* Elliot) on acute gastric hemorrhagic lesions in rats. *J. Agric food chem.*, 52, 2226-2229.

Milchaelsen, T.E., Gilje, A., Samuelsen, A.B., Høgåsen, K. & Paulsen, B.S. (2000).: Interaction between human complement and pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology* 52, 483-490.

Molden, E. & Skymoene, L.R. (2004/2005).: CYP450-Historikk og fakta.

<http://www.cyp450.no/indexB.htm> sett 18.april 2009

Molden, E. & Spigset, O. (2007).: Legemidler i praksis: Frukt og bær-interaksjoner med legemidler. http://www.tidsskriftet.no/index.php?seks_id=1628072 sett 18.april 2009

Opsahlseter, T. (2008).: Kjemisk og biologisk karakterisering av bærekstrakter fra svarthyll, *Sambucus nigra*, Masteroppgave ved avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Paulsen, B.S. & Barsett, H. (2005).: Bioactive Pectic Polysaccharides. *Advances in Polymer Science* 186, 69-101.

Pedersen-Bjergaard, S. & Rasmussen, K.E. (2004).: Legemiddelanalyse.

Fagbokforlaget, Bergen. 209, 239–245

Perez, S., Rodriguez-Carvajal, M. A. & Doco, T. (2003).: A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* 85, 109 -121.

Postvoll, L. W. (2006).: Metabolisme av midazolam via CYP3A4 og CYP3A5 in vitro, utvikling av LC/MS-metode for analyse av hydroksylerte metabolitter, Hovedfagsoppgave i farmakologi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Ringerud, A.M. (2003).: Sårhelende planter i Mali. Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider fra *Combretum glutinosum*, Universitetet i Oslo..

Sabine, E.K. & Harshadai M.R.(2008).: Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med.* 1625–1634.

Schols, H.A. & Voragen, A.G.J. (2002).: The chemical structure of pectins. In pectins and their manipulations, ed. Seymour GB & Knox JP, Blackwell Publishing, 1-18.

Sirnes, E. (2003).: Fargestoffer i tropiske planter- Analyse av antocyaner i *Callistemon citrinus*, *Phyllanthus ovalifolia* og *Jacrandra mimosifolia*. Hovedfagsoppgave i organisk kjemi. Kjemisk Institutt, Universitetet i Bergen.

SPECTRUM® LABORATORIES Inc (2009).: Fundamentals of membrane dialysis. <http://eu.spectrapor.com/dialysis/Fund.html> sett 10.februar 2009.

Spigset, O. (2001).: Legemidler i praksis: Cytokrom P-450- systemet. http://www.tidsskriftet.no/index.php?seks_id=448494 sett 18.april 2009

Svendsen, S.(2006).: Aronia - ny suksessrik nisjeproduksjon i Norge <http://www.agropub.no/print.gan?id=4292&subid=0&print=yes> sett 13.juli.2008

Svendsen, S., & Ramberg S.F. (2008).: Hagens pryddplanter inn på kjøkkenet 3, 2-23.

Taiz, L. & Zeiger, E. (1998).: Plant and cell architecture og cell walls: structure, Biogenesis and expansion. *Plant physiology*. Sinauer associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA, 9, 411-424.

Valcheva-Kuzmanova, S. & Belcheva, A. (2006).: Current knowledge of *Aronia melanocarpa* as a medicinal plant. *Folia medica*. 48, 11-16

Yamada, H. & Kiyohara, H. (1999).: Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. *Immunomodulatory Agents from Plants*, 161-202.

Izydorczyk, M. (2005).: Understanding the Chemistry of Food Carbohydrates. In *Food Carbohydrates, Chemistry, Physical Properties and Applications*, Taylor & Francis Group, ed. Cui, S.W., 2-27, 51-63.

Yamada, H. & Kiyohara, H. (2007).: Immunmodulating activity of plant polysaccharide structures. Comprehensive glycoscience 4, 664-673.

Wikipedia (2007).: Aronia. <http://en.wikipedia.org/wiki/Chokeberry> sett 23.april 2009